



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**Análisis de la composición de la microbiota  
bacteriana intestinal en ratones deficientes del  
sensor innato NLRP3 en un modelo de  
infección con *Taenia crassiceps***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**BIOLOGO**

**PRESENTA:**

**DIEGO MATEOS ARENAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSE LUIS REYES HERNANDEZ**



**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

-A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por la formación académica y cultural que me ha brindado,

-A la MVZ María Leticia y al Biol. Tomas Ernesto Villamar por el apoyo en el mantenimiento de las colonias de los animales de experimentación para la realización de este proyecto.

-Al Doctor José Luis por aceptarme en el laboratorio y su guía a lo largo del proyecto, a la Bióloga Marisol Hernández por el trabajo como Técnico y su apoyo en el trabajo de laboratorio.

-Al área de secuenciación masiva del Laboratorio Nacional en Salud y Enfermedades Crónico-Degenerativas de la FESI UNAM.

-A los doctores Miguel Ruiz y Héctor Martínez por su apoyo en la realización de este proyecto

-Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIT) IN215323.

## **Dedicatoria**

Este pequeño logro se lo dedico a mis padres, sin ustedes esto no hubiera sido posible, gracias por el apoyo y el cariño que me han dado a lo largo de mi vida, y sobre todo cuando inicie esta carrera, gracias por todas las cosas que me han dado, incluso los regaños, todo eso forma parte de lo que soy ahora y el por qué puedo escribir esto, los quiero.

A mi hermana, gracias por estar siempre para mí, aunque no seamos del todo apegados, mucho de lo que soy te lo debo a ti.

A mis tíos, gracias por el apoyo y siempre estar cuando los necesito, y por tratarme como si fuera su propio hijo.

A mi familia en general, gracias por ser una familia amorosa, comprensiva y unida.

A mi mejor amigo Nahum, eres como un hermano para mí, sé que siempre puedo contar contigo, para quejarme, reír o solo platicar sobre la vida, gracias amigo.

A mis amigas de la carrera, gracias por acompañarme por esta etapa de mi vida.

A mis amigos del laboratorio, gracias por los buenos ratos y hacer más ameno el trabajo, en especial a mi amigo Mariano y mi amiguita Citlali, gracias por siempre estar para sacarme una sonrisa.

A la bióloga Marisol Ibet y al doctor José Luis, gracias por aceptarme como un miembro mas de su equipo y hacerme sentir bienvenido, así como todas las enseñanzas que he adquirido gracias a ustedes.

# Índice

<b>1. Resumen</b> .....	6
<b>1.1 Abstract</b> .....	7
<b>2. Introducción</b> .....	8
2.1. Inflamasoma NLRP3 .....	8
2.1.1. Composición y función.....	8
2.1.2. Papel de NLRP3 en infecciones por helmintos. ....	10
2.2. <i>Taenia crassiceps</i> .....	11
2.2.1. Ciclo de vida.....	11
2.2.2. Respuesta inmunológica a <i>T. crassiceps</i> .....	13
2.3. Microbiota bacteriana.....	14
2.3.1. Microbiota y el inflamasoma NLRP3. ....	14
2.3.2. Microbiota y las infecciones por helmintos.....	15
<b>3. Justificación</b> .....	17
<b>4. Hipótesis</b> .....	17
<b>5. Objetivo general</b> .....	18
5.1. Objetivos particulares.....	18
<b>6. Materiales y Métodos</b> .....	18
6.1. Animales experimentales, genotipo y experimento de intercambio de microbiota. .	18
6.2. Infección con <i>T. crassiceps</i> .....	20
6.3. Determinación de carga parasitaria.....	20
6.4. Extracción y cuantificación de DNA de muestras fecales. ....	20
6.5. Preparación de las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S .....	21
6.6. Purificación y Etiquetado molecular de las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S. .....	22
6.7. Secuenciación masiva y flujo bioinformático.....	24
<b>7. Resultados</b> .....	26
7.1. Genotipificación de ratones deficientes de NLRP3.....	26
7.2. Extracción del DNA genómico bacteriano y preparación de bibliotecas para secuenciación masiva.....	26
7.3. Identificación taxonómica de la microbiota.....	30
7.4. Diversidad alfa y análisis de componentes principales. ....	35
7.5. Bacterias con diferencias significativas en los diferentes grupos de estudio. ....	37

<b>8. Discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>9. Conclusión.....</b>	<b>51</b>
<b>10. Referencias .....</b>	<b>52</b>

## 1. Resumen

El inflamasoma NLRP3 es un complejo proteico crucial en la respuesta inmune innata contra los diversos patógenos que afectan al huésped. Se ha reportado que el receptor NLRP3 está involucrado en las respuestas inmunitarias de tipo Th1 y Th2, esto último se observó en infecciones helmínticas, en las cuales, NLRP3 puede tomar un papel regulador dependiendo del tipo de helminto con el cual se lleve a cabo la infección. Dentro de este tipo de infecciones encontramos la infección experimental con *Taenia crassiceps*, en donde este parásito genera una respuesta de tipo Th2 y células con funciones supresoras, principalmente macrófagos. Otro factor importante relacionado con la modulación de la respuesta inmune y la infección con helmintos, es la microbiota, ya que la composición de esta afecta de manera positiva y/o negativa a la supervivencia y proliferación de parásitos helmintos. Sin embargo, se desconoce si la infección con *T. crassiceps* puede modificar a dicho componente. Por otro lado, se sabe que los ratones deficientes de NLRP3 presentan una mayor resistencia hacia *T. crassiceps*, por lo que el objetivo de este trabajo, es analizar la composición de la microbiota bacteriana intestinal en ratones deficientes de NLRP3 y ratones WT infectados con *T. crassiceps*, esto para determinar las posibles bacterias que estén influyendo en la resistencia contra este parásito. Para esto se realizó una secuenciación masiva de las subunidades V3 y V4 del gen RNA ribosomal 16S extraído de las heces de los ratones en diferentes tiempos de infección. Adicional a esto se realizó un experimento de intercambio de microbiota. Se encontró un cambio en la composición microbiana en los diferentes grupos de estudio, destacando taxones de los géneros *Lactobacillus*, *Dubosiella*, *Prevotella*, *Muribaculum*, *Ileibacterium*, *Lachnospira*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Clostridium*, los cuales cambiaron su abundancia relativa en las diferentes cepas y tiempos de infección, mostrando que, tanto NLRP3 como *T. crassiceps* tiene una influencia en la diversidad y composición de la microbiota intestinal, sin embargo la

relación específica de estas bacterias con ellos es desconocida, por lo que se sugieren estudios enfocados en dicha relación.

## 1.1 Abstract

The NLRP3 inflammasome is a crucial protein complex in the innate immune response against various pathogens affecting the host. It has been reported that the NLRP3 receptor is involved in both Th1 and Th2 immune responses, with the latter observed in helminth infections, where NLRP3 can play a regulatory role depending on the type of helminth involved in the infection. One example of such infections is the experimental infection with *Taenia crassiceps*, where this parasite induces a Th2 response and suppressive cells, mainly macrophages. Another important factor related to the modulation of the immune response and helminth infection is the microbiota, as its composition can positively and/or negatively affect the survival and proliferation of helminth parasites. However, it is unknown whether infection with *T. crassiceps* can modify this component. Additionally, it is known that NLRP3-deficient mice show greater resistance to *T. crassiceps*. Thus, the objective of this work is to analyze the composition of the intestinal bacterial microbiota in NLRP3-deficient mice and WT mice infected with *T. crassiceps* to identify potential bacteria influencing resistance to this parasite. To achieve this, massive sequencing of the V3 and V4 subunits of the 16s ribosomal RNA gene extracted from mouse feces at different infection times was performed. Additionally, a microbiota transfer experiment was conducted. A change in microbial composition was observed across the different study groups, with notable changes in the relative abundance of taxa from the genera *Lactobacillus*, *Dubosiella*, *Prevotella*, *Muribaculum*, *Ileibacterium*, *Lachnospira*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, and *Clostridium* across different strains and infection times. This indicates that both NLRP3 and *T. crassiceps* influence the diversity and composition of the intestinal microbiota. However, the specific relationship between these bacteria and the aforementioned factors remains unknown, and further studies focused on this relationship are suggested.

## 2. Introducción

### 2.1. Inflamasoma NLRP3

#### 2.1.1. Composición y función

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del huésped contra los diversos patógenos, esta se basa en receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales se expresan principalmente en células inmunes e inflamatorias como monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, estos receptores reconocen componentes microbianos conservados, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Schroder y Tschopp, 2010 ; Fullard y O'Reilly, 2015).

Actualmente, se han identificado 4 clases diferentes de subfamilias de PRRs, las proteínas transmembranales como los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores de lectina tipo C (CLRs) y las proteínas citoplasmáticas como los receptores tipo I del gen inducible por ácido retinoico (RIG) (RLR) y los receptores tipo NOD (NLR) (Takeuchi y Akira 2010). Estos últimos pueden iniciar el ensamblaje de inflamasomas, que son complejos proteicos que actúan como sensores y son detonadores de la respuesta inflamatoria, se han identificado numerosos inflamasomas , incluidos NLRP1, NLRP2, NLRP3, entre otros (Ozaki et al., 2015).

Dentro de estos el mejor caracterizado es el inflamasoma NLRP3, también conocido como criopirina. La proteína NLRP3 está conformada de 3 dominios, un dominio de pirina N-terminal (PYD), en el carboxilo-terminal se encuentra un dominio con repeticiones ricas en leucina (dominio LRR), y una zona central que se conoce como dominio NACHT (*nucleotide binding and oligomerization domain*), el cual se une a nucleótidos y es el responsable del proceso de oligomerización del inflamasoma (Figura 1) (Montaño et al., 2017 ; Hernández y Urcuqui 2012). La función de NLRP3 es la activación de la caspasa-1, también conocida como enzima convertidora de la interleucina-1 (IL-1), la cual se encarga de separar los componentes de la forma

precursora de la IL-1 $\beta$  e IL-18, generando así los péptidos maduros. Este inflammasoma se conforma por una proteína NLRP3, que captura las señales de peligro y recluta moléculas adaptadoras como ASC (*apoptosis-associated speck like protein*), que funciona como un puente que conecta NLRP3 y procaspasa-1 ; una vez activada la caspasa-1 induce la maduración de las citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 y el procesamiento de gasdermina D para iniciar la liberación de citocinas y muerte celular de tipo piroptosis (Fu y Wu 2023).

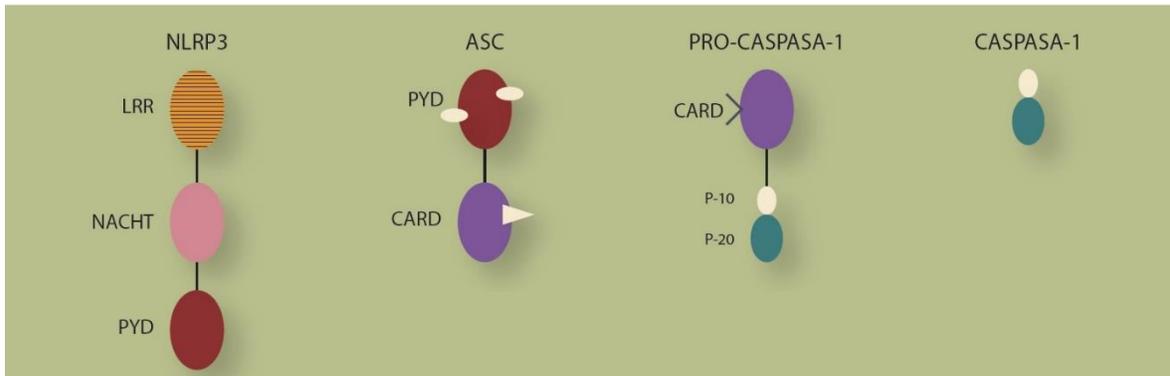


Figura 1. Componentes del inflammasoma NLRP3. Se observan los dominios que conforman a la proteína NLRP3, su proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) y una Pro-Caspasa-1 (Montaño et al. 2017).

El mecanismo preciso de activación del inflammasoma NLRP3 aún no está completamente claro, pero varios estudios han permitido demostrar que lo pueden activar diversas señales, como la variación en las concentraciones intracelulares y extracelulares de K<sup>+</sup> ; mediante el reconocimiento de un incremento en la concentración de ATP extracelular, con la generación de especies ROS derivadas de la mitocondria y mediante la desestabilización fago-lisosomal que lo activa por medio de moléculas como cristales de urato monosódico, asbestos y sílica (Bandyopadhyay et al., 2013 ; Silverman et al., 2009). A su vez, su activación debe ser un proceso regulado para obtener una respuesta oportuna sin afectar al hospedero, dicha regulación es llevada a cabo mediante interacciones bioquímicas, como la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) derivado de las células T disminuyendo la activación de NLRP3 a través de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o la

autofagia que inhibe su activación mediante la degradación de las mitocondrias dañadas que liberan ROS o por la autofagia que remueve pro IL-1 $\beta$ , entre otros (Buelvas y Suárez 2014).

### 2.1.2. Papel de NLRP3 en infecciones por helmintos.

El complejo NLRP3 es fundamental para la respuesta inmune del huésped contra infecciones bacterianas, fúngicas y virales, ya que este promueve una respuesta inmunitaria de tipo 1 mediante la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Thomas et al. 2009 ; Allen et al. 2009 ; McIntire et al. 2009), por su parte hay evidencias de que, además de promover respuestas proinflamatorias, los inflamasomas pueden influir directa o indirectamente en las respuestas inmunes de tipo 2, por ejemplo, la activación de NLRP3 promueve la inflamación alérgica de tipo 2 en algunos modelos murinos, en contraste a esto, otros estudios sugieren que NLRP3 puede suprimir las respuestas inmunes de tipo 2 mediante la inactivación de la alarmina IL-33. Las respuestas inmunitarias de tipo 2 se asocian con inmunidad protectora a los helmintos, aunque se sabe muy poco sobre si los inflamasomas controlan la inmunidad a la infección por estos parásitos (Besnard et al. 2011 ; Cayrol y Girard 2009).

Estudios recientes mostraron que ratones deficientes de NLRP3 fueron altamente resistentes contra *Taenia crassiceps*, esto se relacionó con una producción disminuida de IL-4, altos niveles de IL-15 y una disminución dramática en los macrófagos supresores que se infiltran en el peritoneo, sugiriendo que NLRP3 es un componente de la inmunidad innata requerida para que *T. crassiceps* se establezca (Flores-Sotelo et al. 2024). De manera similar se ha reportado que los ratones deficientes de NLRP3 mostraron una reducción de citocinas de tipo 1 y una inmunidad protectora de tipo 2 aumentada en una infección con el nematodo *Trichuris muris*, lo que podría indicar que NLRP3 influye tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, sugiriendo que atacar el inflamasoma NLRP3 puede ser un enfoque para limitar la carga de enfermedad asociada con las infecciones por helmintos. (Alhallaf et al. 2018). También se ha reportado que en otro nematodo, *Nippostrongylus brasiliensis*, los ratones deficientes de NLRP3 tuvieron un aumento

de neutrofilos y eosinofilos, lo que se correlaciona con una mayor expulsión de gusanos y por tanto, una mayor resistencia a la infección, sugiriendo que NLRP3 tiene un papel en la restricción de la neutrofilia, la eliminación de helmintos y las respuestas inmunitarias tipo 2 de una manera independiente del inflamasoma (Chenery et al. 2019).

En contraste a lo anterior, se reportó que en una infección con el nematodo *Trichinella spiralis*, los ratones deficientes de NLRP3 son más susceptibles a la infección al mostrar una mayor carga parasitaria, pudiendo indicar que NLRP3 en las células dendríticas expuestas a los productos excretados por estas larvas desempeña un papel en la activación de la respuesta Th2 y Treg, identificando así, por primera vez la participación de NLRP3 en la resistencia del huésped contra *T. spiralis* (Jin et al. 2020). Esto indica que NLRP3 es un regulador importante en las infecciones por helmintos parásitos y dependiendo del helminto este receptor ejerce un papel diferente en la resistencia y/o susceptibilidad del huésped.

## 2.2. *Taenia crassiceps*.

### 2.2.1. Ciclo de vida

*Taenia crassiceps* es un parásito perteneciente a los cestodos, su ciclo de vida es de transmisión completamente zoonótico al presentar un hospedero intermediario, los cuales son pequeños mamíferos, incluidos ratones, conejos y otros roedores, en los cuales, solo se presentara una etapa larvaria o metacestodo del parasito alojándose en el tejido conectivo subcutáneo y las cavidades pleural y peritoneal (Wünschmann et al., 2003), por su parte, el parasito adulto se desarrolla en canidos como los zorros, sin embargo se ha registrado su infección en otros canidos como perros, lobos y coyotes e incluso en algunos félidos desarrollándose en el lumen intestinal (Lescano y Zunt 2013 ; Castañeda 2016).

El ciclo de vida de *T. crassiceps* inicia con el adulto expulsando proglótidos grávidos, es decir, los segmentos que contienen huevos separados del gusano producidos a través de reproducción sexual por hermafroditismo, los cuales serán excretados por

el hospedador definitivo, para que el huésped intermediario ingiera los huevos infecciosos, una vez dentro del roedor, los proglótidos perderán su cubierta liberando las oncósferas, estas atravesarán las paredes intestinales y entrarán al flujo sanguíneo, alcanzando así los músculos, el tejido subcutáneo y la cavidad peritoneal, es en esta última donde los cisticercos se reproducirán asexualmente por gemación, hasta alcanzar cargas masivas de parásitos, finalmente el ciclo termina con el hospedador definitivo ingiriendo al roedor incluyendo los parásitos que se establecerán en el lumen intestinal (Ostoa-Saloma et al. 2010).

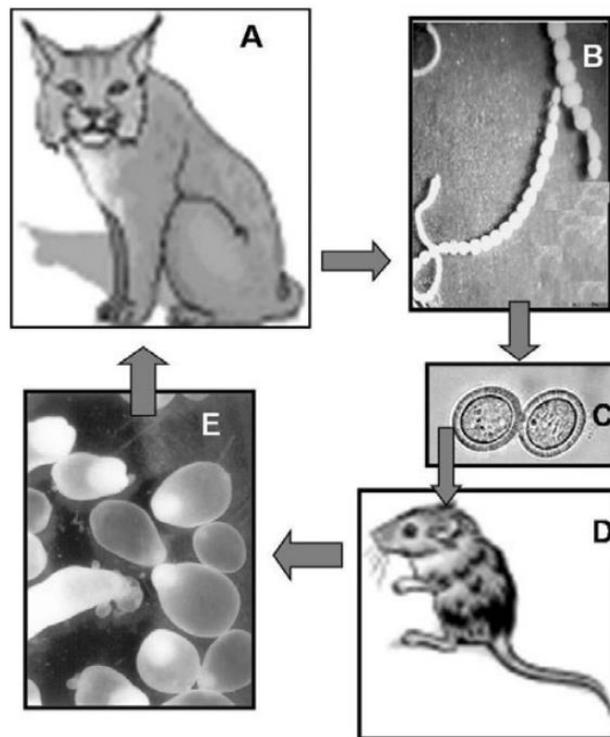


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. A) Hospedero definitivo. B) Fase adulta que permanece dentro del hospedero definitivo. C) Proglótidos que liberarán las oncósferas dentro del hospedador intermediario D) Hospedero intermedio. E) Larva cisticercos o metacístodo que será ingerida por el hospedero definitivo. (Imagen tomada de: Willms, & Zurabian, 2009).

### 2.2.2. Respuesta inmunológica a *T. crassiceps*.

Se ha reportado que las infecciones por helmintos generan una respuesta de tipo Th2, caracterizada por el aumento de las citocinas IL-4, IL-10 y IL-13, aunado a esto, hay una predominancia de anticuerpos de tipo IgG1 e IgE , acompañados de una expansión y movilización de células efectoras específicas, como mastocitos, eosinófilos y basófilos (Maizels et al. 2004 ; Reyes, 2011 ).

Gracias a la capacidad que tiene *T. crassiceps* para proliferar dentro de la cavidad peritoneal de roedores, ha permitido utilizar modelos murinos para poder estudiar los mecanismos de inmunomodulación que ocurren durante la infección de este parásito, por un lado, se encontró que las hembras son más susceptibles a la infección con este parásito en comparación que los machos, sugiriendo que los esteroides sexuales toman un papel importante, tales como el estradiol y los estrógenos que favorecen al parásito (Morales et al. 2008), otro descubrimiento importante, es la respuesta a largo plazo que tiene el sistema inmune a la infección, ya que en su etapa aguda se ha encontrado una predominancia en la producción de interferón gama (IFN-  $\gamma$ ), característico de una respuesta Th1, pero, mientras el tiempo de infección transcurre la respuesta Th1 empieza a disminuir de manera abrupta y en simultaneidad una respuesta Th2 comienza a presentarse con un alta producción de IL-4, IL-13 y Prostaglandina E2 (PGE2), sugiriendo que el parásito se favorece de un microambiente en donde abundan estas moléculas (Terrazas et al. 1998).

Por lo tanto, las principales estrategias de evasión inmune que posiblemente presente *T. crassiceps* es la inducción de una respuesta Th2 por parte del hospedador, así como el reclutamiento de macrófagos supresores en la zona de infección, sin embargo, los mecanismos por los cuales *T. crassiceps* genera este microambiente de regulación que le permite permanecer de manera indefinida en su hospedero son desconocidos (Valdor, 2012).

## 2.3. Microbiota bacteriana

### 2.3.1. Microbiota y el inflamasoma NLRP3.

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. En el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a  $10^{12}$ - $10^{14}$  aproximadamente, dicho número es mayor incluso que el de las células propias del hospedador (Icaza 2013). Debido a esto, la microbiota intestinal es considerado por algunos autores como un “órgano metabólico”, con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica (O’Hara y Shanahan 2006). Evolutivamente, en los mamíferos, los organismos que componen la microbiota son determinados por los tipos de fuentes nutricionales, las características de la dieta y los factores genéticos, todo esto influye en el predominio de unos microorganismos sobre otros (Duncan et al. 2008).

Específicamente, la microbiota intestinal no solo contribuye a la absorción y el metabolismo de nutrientes en el cuerpo, sino que también compite con patógenos bacterianos y fúngicos por nutrientes, así como por sitios de unión, lo que provoca una resistencia en su colonización de la mucosa intestinal, produciendo sustancias antibacterianas e inhibiendo el crecimiento de patógenos, permitiendo así, el funcionamiento y reforzamiento de la inmunología gastrointestinal (Cheng et al. 2019). Por su parte, la misma inmunidad innata juega un papel clave, esto a través del reconocimiento de PAMPs, los cuales son reconocidos por los receptores innatos de las células inmunes, entre estos, el inflamasoma NLRP3 (Rescigno et al. 2001). Es debido a esta interacción que se tiene entre la composición microbiana y los receptores inmunológicos, evidencia reciente sugiere que NLRP3 puede tener un papel en la conexión intestino-microbio, pues la microbiota intestinal es crucial en la activación del inflamasoma NLRP3 al ser este un mediador importante de las respuestas inflamatorias inducidas por el microbioma, de igual manera existe una gran probabilidad de que la composición de la microbiota intestinal pueda verse influenciada por la activación del inflamasoma NLRP3, a pesar de estos hallazgos, aún falta una comprensión detallada de las interacciones entre el inflamasoma y la microbiota intestinal. (Zhang et al . 2022).

Se ha reportado que en ratones deficientes del inflammasoma NLRP6 en células epiteliales colónicas de ratón, se observa una microbiota fecal alterada caracterizada por una representación expandida de los filos bacterianos Bacteroidetes (*Prevotellaceae*) y TM7 en comparación con su contraparte Wild Type (WT), esto se relacionó con una disminución drástica en la producción de IL-18 en los ratones deficientes de NLRP6 (Elinav et al. 2011), reforzando la relación entre la microbiota y los inflamasomas.

### 2.3.2. Microbiota y las infecciones por helmintos.

Los miembros de la microbiota y los parásitos viven en el cuerpo humano desde hace siglos y dado que el parásito necesita un huésped para sobrevivir, es inevitable que se encuentre e interactúe con miembros de la microbiota cuando se instala en el cuerpo humano (Eckburg et al. 2005), por tanto, la microbiota puede cambiar la supervivencia, reproducción y virulencia del parásito, así como los parásitos pueden ser eficaces en la reducción o proliferación de componentes de la misma (Fekete et al. 2021). De igual manera, se sabe que los microbiomas intestinales modulan la susceptibilidad del huésped a patógenos infecciosos, particularmente parásitos intestinales, al influir en el desarrollo y maduración de las respuestas inmunes (Beyhan y Yildiz 2023).

Específicamente en las infecciones con helmintos, en primera instancia, se sabe que un aspecto importante es la necesidad de microbiota al inicio de una infección para que esta sea exitosa, por ejemplo, en un modelo murino de infección por el nematodo *Heligmosomoides polygyrus*, los parásitos que infectaron a ratones libres de gérmenes tuvieron una fecundidad reducida y un perfil de expresión génica distinto, sugiriendo que la microbiota estimula vías inmunomoduladoras que benefician a los parásitos, de igual manera, se reportó que la carga de infección por *H. polygyrus* se correlaciona positivamente con la abundancia de especies de *Lactobacillus/ Lactococcus* en el duodeno de estos ratones, pero no con otras bacterias (Rausch, et al. 2018 ; Llinás y Caraballo 2022). Otro ejemplo relacionado, es la infección de ratones con *Trichuris muris*, se reportó que los huevos de este

parásito necesitan contacto directo con bacterias comensales como *Escherichia coli* para poder eclosionar, induciendo la expresión de moléculas de adherencia en la superficie bacteriana como las fimbrias de tipo 1 (Hayes et al. 2010).

En contraste a lo anterior, también se han reportado evidencias del efecto opuesto, es decir, cuando la microbiota es un factor que ayuda a la resistencia contra la infección. En un estudio con el nematodo *Trichinella spiralis*, donde se trató con antibiótico, se reportó que a través de beta-glucanos se dio una expulsión significativa del parásito, indicando que dicho efecto depende de la microbiota, siendo mediado por una mayor producción y secreción de moco, esto se relacionó con *Akkermansia muciniphila*, una especie de bacteria que mejora la producción de la capa de mucinas en el intestino y reduce la carga de gusanos de *T. spiralis* a través del receptor tipo Toll 2 (TLR2) (Lee et al. 2019).

Por el lado contrario, la influencia de los helmintos parásitos hacia la microbiota también es evidente, en una infección con *H. polygyrus* se descubrió que especies de *Lactobacillaceae* en el duodeno y el íleon aumentan su proliferación en una cepa de ratones susceptibles, de igual manera aumenta la abundancia de otros taxones, como se informó para una especie no identificada perteneciente a la familia *Peptostreptococcaceae*, y las *Enterobacteriaceae* y Bacteroides gram negativos en múltiples sitios intestinales. De manera similar en infecciones crónicas con *Trichuris muris* se reduce la diversidad alfa de la microbiota intestinal y cambia su composición, con una reducción en la diversidad y abundancia de Bacteroidetes, como *Prevotella* y *Parabacteroides*, y una mayor abundancia de *Lactobacillus* (Rapin et al. 2020 ; Houlden et al. 2015).

Todo lo anterior indica que la microbiota está involucrada en la regulación de la colonización intestinal por parásitos helmintos, donde, algunos helmintos requieren de componentes microbianos del huésped para establecer una infección y a su vez la presencia de estos afecta la composición de la misma microbiota.

### 3. Justificación

La cisticercosis producida por metacestodos de *Taenia solium* es una infección parasitaria ampliamente distribuida que afecta a los humanos. *Taenia crassiceps* presenta homología con *T. solium* en cuanto a antígenos se refiere, por lo que la cisticercosis murina experimental con *T. crassiceps* ha sido utilizada para explorar el papel de los factores biológicos e inmunológicos involucrados en las interacciones hospedador-parásito. Por otra parte, el inflammasoma NLRP3 tiene un papel importante para que *T. crassiceps* prolifere de manera exitosa dentro del hospedador por diversos factores, entre ellos la microbiota, que se ha vuelto un objetivo de estudio para la comprensión y búsqueda de tratamiento contra este tipo de patógenos. Los estudios centrados en infecciones por tenías son escasas y la composición bacteriana que influye en el parásito es desconocida. La identificación de taxones bacterianos dentro del tracto intestinal que podrían ayudar a la proliferación y/o reducción de la carga parasitaria en presencia o ausencia de NLRP3, establecería una línea de investigación para conocer sobre la naturaleza de las infecciones por este tipo de parásitos, así como el papel de NLRP3 en dichas infecciones.

### 4. Hipótesis

La ausencia del receptor NLRP3, provocará un cambio en la composición de la microbiota intestinal, lo cual aumentaría la resistencia a la infección con *T. crassiceps*. Por su parte, la infección intraperitoneal con metacestodos de *T. crassiceps* podría regular la composición de la microbiota intestinal a pesar de ser un parásito de la cavidad peritoneal y no parasitar el tracto gastrointestinal.

## 5. Objetivo general

-Comparar la composición de la microbiota bacteriana intestinal en ratones silvestres (WT) y ratones deficientes del receptor NLRP3 <sup>-/-</sup> antes y durante la infección con *Taenia crassiceps*.

### 5.1. Objetivos particulares

-Establecer el modelo murino y obtener muestras fecales de ratones silvestres WT y ratones deficientes de NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados con *T. crassiceps* a diferentes tiempos de infección.

-Generar las bibliotecas para las subunidades V3 y V4 del gen RNA ribosomal 16S, para identificar a las diversas comunidades bacterianas.

-Etiquetar molecularmente las bibliotecas y realizar un pool para la secuenciación masiva.

-Identificar la composición de la microbiota intestinal de los ratones deficientes de NLRP3 y WT.

## 6. Materiales y Métodos

6.1. Animales experimentales, genotipo y experimento de intercambio de microbiota.

Se utilizaron ratones hembras de tipo silvestres (WT) y deficientes del receptor NLRP3 (NLRP3 <sup>-/-</sup>) de 8 semanas de edad, ambos con un fondo genético C57BL/6. Las colonias de animales se criaron y mantuvieron en nuestras instalaciones, el uso de estas colonias fue aprobado por el Comité de Bioética (CE/FESI/042022/1513) y cumplieron con las recomendaciones emitidas por el gobierno para el cuidado de

animales experimentales (NOM-062-ZOO-1999). Para identificar la cepa del ratón, se extrajo DNA a partir de un fragmento de cola del ratón. La muestra se trató con 500 µl de Buffer de lisis y 4 µl de proteinasa K, se dejó incubando por 24 horas a 56°C, posteriormente se extrajo el DNA genómico a través de un proceso de isopropanol y etanol al 75%. El genotipado se realizó por PCR para confirmar la deficiencia del receptor NLRP3, las secuencias utilizadas fueron: Forward ATTACCCGCCCCGAGAAAGG, Reverse 1 TTGTAGTTGCCGTCGTCCTT y Reverse 2 TGAGGTCCACATCTTCAAGG , para finalmente realizar un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio para observar la amplificación. El PCR se realizó con los siguientes componentes y condiciones:

	1 rxn
Master Mix	12.5 µl
Oligo Forward	1 µl
Oligo Reverse 1 (10nM)	1 µl
Oligo Reverse 2 (10nM)	1 µl
H2O libre de nucleasas	8.5 µl
DNA	1 µl

STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3	
95° C (4:00 Min)	95°C (0:30 Min)	60°C (0:40 Min)	72°C (0:30 Min)	72°C (5:00 Min)	4°C
1 x	40 x			1 x	∞ x

Una vez verificado el genotipo, se formaron 4 grupos de estudio con 3 repeticiones; Un grupo de ratones deficientes del receptor NLRP3 <sup>-/-</sup>, un grupo WT y 2 grupos de NLRP3 <sup>-/-</sup> y WT que se mantuvieron cohabitando (CoH) la misma caja durante 4

semanas, marcando los ratones para diferenciar las cepas, pasadas las 4 semanas se separaron y se procedió a la infección.

## 6.2. Infección con *T. crassiceps*

Los grupos experimentales fueron infectados intraperitonealmente (ip.) con 20 metacéstodos no gemantes de 2 mm aproximadamente de la cepa ORF de *T. crassiceps*, dichos metacéstodos se mantienen mediante pasajes seriados en ratones BALB/c hembras y, tras ocho semanas de infección, los parásitos se recolectan de la cavidad peritoneal, se lavan con solución salina y se seleccionan aquellos que cumplan los requisitos para la infección.

## 6.3. Determinación de carga parasitaria.

A las 8 semanas de la infección, los ratones se anestesiaron y se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se inyectaron intraperitonealmente con 8 ml. de solución salina estéril para realizar un lavado, la solución se recuperó junto con los metacéstodos en un tubo de 50 ml para ser colocados en cajas Petri, ser lavados y realizar el conteo.

## 6.4. Extracción y cuantificación de DNA de muestras fecales.

Se recolectaron heces de los diferentes grupos de estudio al inicio del experimento (control), a las 4 semanas y a las 8 semanas post infección. La extracción del DNA se realizó con el kit de Dneasy Blood & Tissues (Qiagen, Alemania). Brevemente, las muestras colectadas se pesaron 0.01 g. de cada una, posteriormente se preparó una solución de buffer de lisis con 0.02 g. de enzima lisosoma por cada ml. de buffer, se agregaron 180 µl de la solución a cada muestra y se incubaron por 30 min a 37°C. Después de la incubación se les agregó 20 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer de lisis AL, se incubaron 30 minutos a 56°C, adicionalmente se les agregó 10 µl de enzima RNAsa y se incubaron 30 min a 37°C, una vez terminada el tratamiento

con la RNAsa se siguió el protocolo y eluyendo las muestras en 100 µl de agua. El DNA se cuantificó por fluorometría (Quantus, Promega) y la integridad se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.

### 6.5. Preparación de las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S.

Se tomaron 50 ng del DNA para la preparación de las bibliotecas de secuenciación masiva amplificando las subunidades V3 y V4 del gen RNA ribosomal 16S con oligos que incluyen adaptadores de Illumina, con la siguiente secuencia, Forward TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCTACGGGNGGCWGCAG y Reverse GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA TCC, en un volumen final de 50 µl con los siguientes componentes (colocados en ese orden):

	1 rxn
Go-tag Mix	25 µl
Oligo Forward (10 nm)	1 µl
Oligo Reverse (10 nm)	1 µl
H2O libre de nucleasas	13 µl
DNA (50 ng)	10 µl

Una vez realizada la reacción, para la formación y amplificación de bibliotecas se colocaron en el termociclador (Bio-rad) con las siguientes condiciones:

STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3	
95° C (3:00 Min)	95°C (0:30 Min)	55°C (0:30 Min)	72°C (0:30 Min)	72°C (5:00 Min)	4°C
1 x	35 x			1 x	∞ x

Finalmente se realizó un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro para verificar la amplificación de las bibliotecas.

## 6.6. Purificación y Etiquetado molecular de las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S.

Una vez obtenidas las bibliotecas, éstas se purificaron a través de perlas Ampure a una concentración de 0.8%, posteriormente dio vórtex y se colocaron las muestras en una gradilla magnética y se retiró el sobrenadante por pipeteo. Adicionalmente, se realizó un lavado con etanol al 80% colocando 200 µl a la muestra y dejando en la gradilla magnética, y retirando el etanol (Se realizaron 2 lavados con etanol), se dejaron secar las perlas de los tubos a temperatura ambiente y finalmente se eluyeron las muestras en 30 µl de agua. El etiquetado molecular se efectuó con los barcodes P5 y P7 organizando las muestras de la siguiente manera:

Muestra	Etiqueta molecular	
	i5	i7
E1_WR1C	502	706
E1_WR2C	503	706
E1_WR3C	505	706
E1_NR1C	506	706
E1_NR2C	507	706
E1_NR3C	508	706
E1_W4SR1C	510	706
E1_W4SR2C	511	706
E1_W4SR3CH	502	707
E1_W4SR5CH	503	707
E1_W4SR6CH	505	707
E1_N4SR1C	506	707
E1_N4SR2C	507	707
E1_N4SR3CH	508	707
E1_N4SR4CH	510	707
E1_N4SR5CH	511	707
E2_W8SR1C	502	710
E2_W8SR2C	503	710
E2_W8SR3CH	505	710
E2_W8SR4CH	506	710
E2_W8SR5CH	507	710
E2_N8SR1C	508	710
E2_N8SR2C	510	710
E2_N8SR3CH	511	710
E2_N8SR4CH	502	711
E2_N8SR5CH	503	711

La adición de las etiquetas se realizó a través de una reacción de PCR cíclica reducida con los siguientes componentes (colocados en ese orden) y condiciones:

	1 rxn
Go-tag Mix	12.5 $\mu$ l
Barcode P5	2.5 $\mu$ l
Barcode P7	2.5 $\mu$ l
H2O libre de nucleasas	2.5 $\mu$ l
Biblioteca DNA	5 $\mu$ l

STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3	
95° C (3:00 Min)	95°C (0:30 Min)	55°C (0:30 Min)	72°C (0:30 Min)	72°C (5:00 Min)	4°C
1 x	10 x			1 x	$\infty$ x

Una vez etiquetados se volvió a realizar una purificación con perlas Ampure colocando 1.12% del total de la muestra (25  $\mu$ l). Siguiendo los mismos pasos que la primera purificación, finalmente se cuantificaron todas las muestras por fluorometría.

### 6.7. Secuenciación masiva y flujo bioinformático.

Con base en la cuantificación, las bibliotecas se diluyeron para una concentración final de 3.4 ng/ $\mu$ l y se colocaron 5  $\mu$ l (17 ng) de cada biblioteca para realizar un pool total, cuya calidad fue evaluada determinando su rendimiento por una cuantificación por fluorometría y su optimización a través de un perfil electroforético de alta resolución en un chip de perfil "Bioanalyzer", para poder realizar dicho perfil, se tomó 0.5  $\mu$ l del pool y se diluyo con 2.35  $\mu$ l de agua para obtener una concentración de 0.6 ng/ $\mu$ l, esto se realizó utilizando la siguiente formula:

$$V2 = \frac{(C1)(V1)}{C2}$$

Posteriormente, con base al número de pares de bases que nos indicó el perfil electroforético se realizaron los cálculos para obtener la nano molaridad del pool, a través de esta fórmula:

$$nM = \frac{\text{Rendimiento (ng / } \mu\text{l)}}{(\text{N. de bases del pool})(660)} = x/0.000001$$

Para poder secuenciar masivamente las bibliotecas, se utilizó un secuenciador de Miseq de Illumina, en un formato de 2X250 pair-end y una profundidad teórica de 100,000X , para esto se realizaron los cálculos para obtener el volumen necesario para tomar 20 pico molar del pool siguiendo esta fórmula:

$$V = \frac{(1000)(0.02)}{nM \text{ del pool}}$$

El flujo de trabajo bioinformático consistió en dos partes: 1) evaluación de la calidad del llamado de bases con el programa MultiQC y ensamble de la lectura sentido y antisentido con PEAR e 2) identificación taxonómica de las especies bacterianas con el programa de QIIME2, de estos últimos, se descartaron todos aquellos que presentaron menos del 1% de abundancia relativa en todos los grupos de estudio. Los gráficos de la diversidad alfa, análisis de componentes principales (PCA) y la abundancia relativa de los taxones se procesaron con R. Las diferencias significativas presentes entre los grupos de estudio se detectaron a través de una prueba de *t* de student en el programa de GraphPad Prism 8.0.1.

## 7. Resultados

### 7.1. Genotipificación de ratones deficientes de NLRP3.

Antes de iniciar la infección con *T. crassiceps*, se genotiparon los dos grupos de ratones por PCR. Los ratones WT y los deficientes de NLRP3<sup>-/-</sup> presentaron un amplicón de 346 pb y 650 pb, respectivamente (Figura 3). Comprobando de esta manera que los grupos de estudio fueran los correctos.

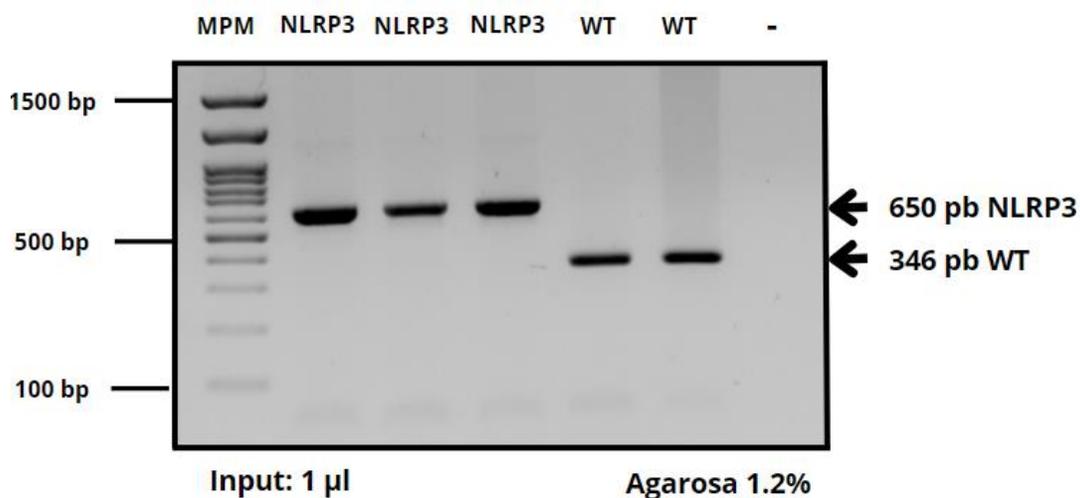


Figura 3. Genotipo en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Se muestran 2 amplificaciones de 650 y 346 pb, indicando un genotipo NLRP3<sup>-/-</sup> y WT respectivamente. MPM: Marcador de peso molecular, bp: Pares de bases, input: DNA que se amplificó.

### 7.2. Extracción del DNA genómico bacteriano y preparación de bibliotecas para secuenciación masiva.

Para poder realizar la secuenciación masiva y la identificación de los componentes de la microbiota, se realizaron bibliotecas de DNA específicas para las subunidades V3 y V4 del gen RNA ribosomal 16S, para esto se extrajo DNA genómico de las heces de ratones antes y después de la infección por *T. crassiceps*. Todas las

muestras que se extrajeron presentaron DNA genómico de alto peso molecular evaluada mediante geles de agarosa (Figura 4). Se amplificó el gen RNA ribosomal 16S en todas las muestras y se observó una banda de amplificación de 550 pb (Figura 5).

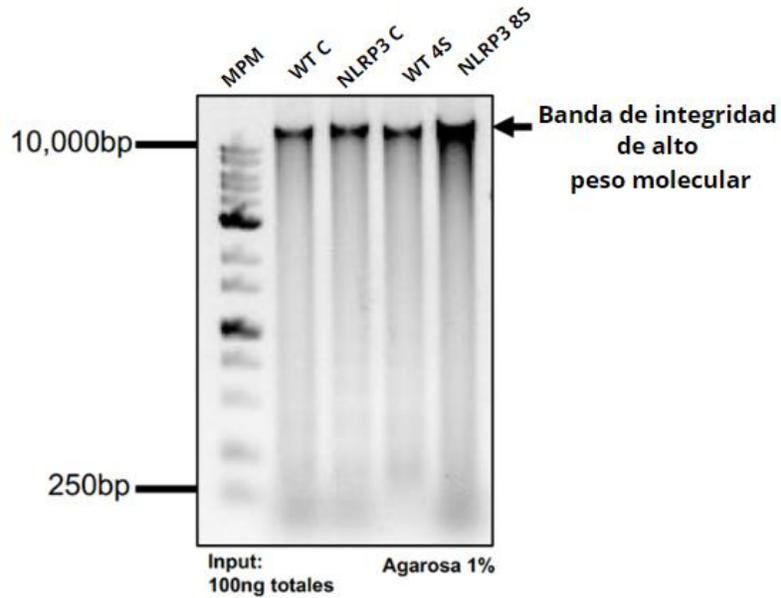


Figura 4. Gel de integridad de DNA al 1% de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se muestran bandas de alto peso molecular indicando una buena integridad de DNA. MPM: Marcador de peso molecular, bp: Pares de bases, input: DNA que se amplificó.

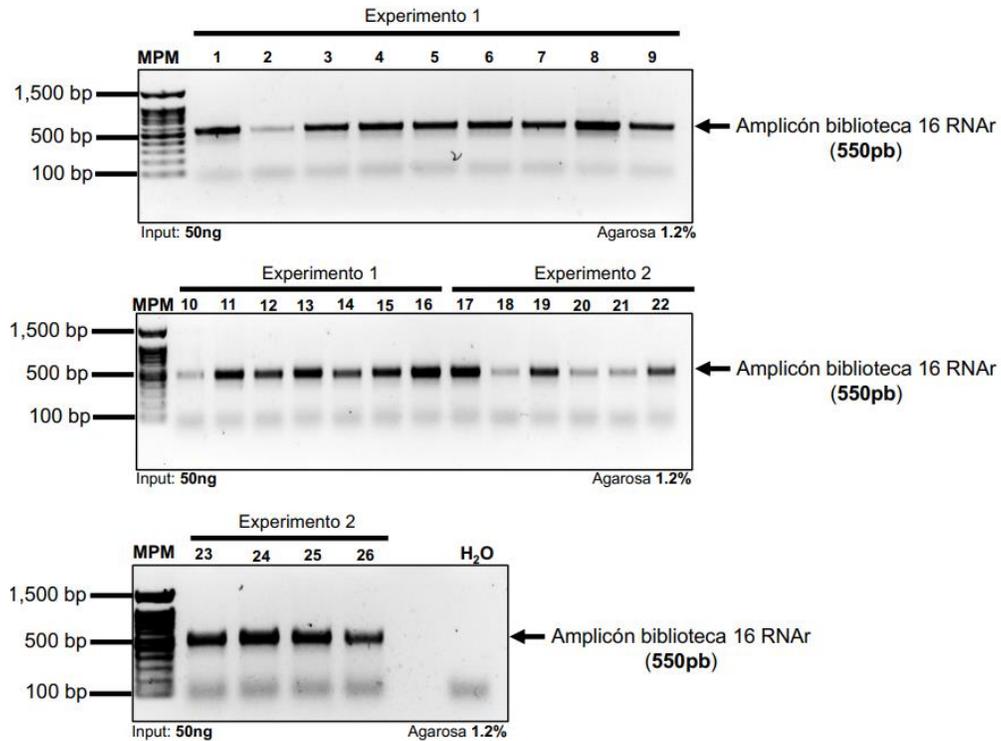


Figura 5. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio con la amplificación de la biblioteca para el gen RNA ribosomal 16S. Se muestran amplificaciones con un tamaño de 550 pb indicando una buena formación de bibliotecas. MPM: Marcador de peso molecular, bp: Pares de bases, input: DNA que se amplifico.

Las bibliotecas presentaron una cantidad promedio de 26 ng/μl (intervalo de 14-30 ng/ul) (Tabla 1). La electroforesis de alta resolución mostró un tamaño de 616 pb para las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S (Figura 6).

Tabla 1. Cantidad y rendimiento de las bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S.

<b>Muestra ID-usuario</b>	<b>Cantidad (ng/μl)</b>	<b>Rendimiento total (ng)</b>
E1_WR1C	26	702
E1_WR2C	14	378
E1_WR3C	24	648
E1_NR1C	26	702
E1_NR2C	28	756
E1_NR3C	29	783
E1_W4SR1C	27	729
E1_W4SR2C	30	810
E1_W4SR3CH	28	756
E1_W4SR5CH	15	405
E1_W4SR6CH	28	756
E1_N4SR1C	24	648
E1_N4SR2C	26	702
E1_N4SR3CH	21	567
E1_N4SR4CH	23	621
E1_N4SR5CH	23	621
E2_W8SR1C	27	729
E2_W8SR2C	14	378
E2_W8SR3CH	23	621
E2_W8SR4CH	16	432
E2_W8SR5CH	17	459
E2_N8SR1C	24	648
E2_N8SR2C	23	621
E2_N8SR3CH	24	648
E2_N8SR4CH	22	594
E2_N8SR5CH	19	513

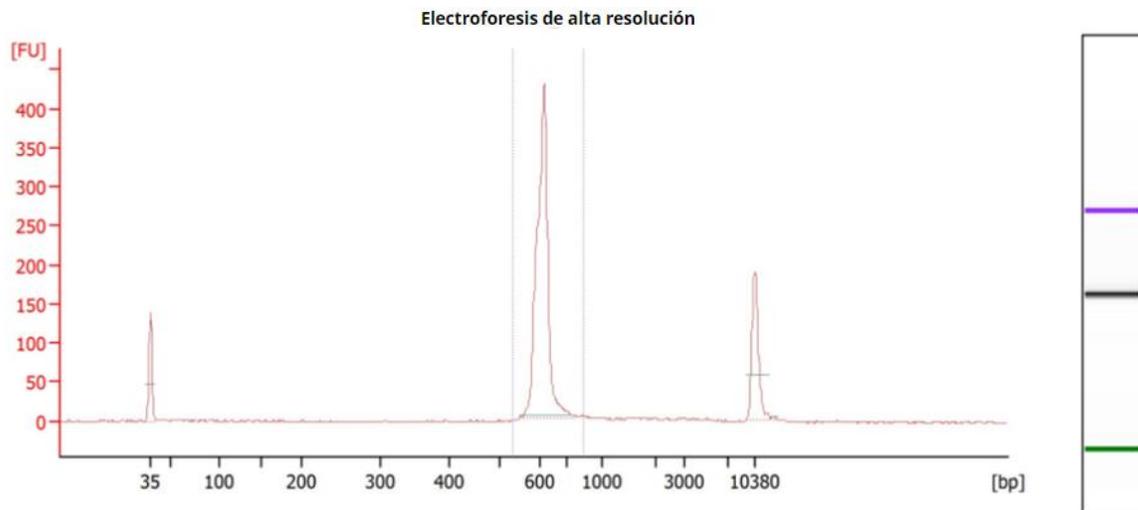


Figura 6. Perfil electroforético de alta resolución para el pool de bibliotecas del gen RNA ribosomal 16S con un tamaño de 616 pb.

### 7.3. Identificación taxonómica de la microbiota.

El análisis de la microbiota en los grupos de estudio identificó 56 familias, 119 géneros y 202 taxones de bacterias diferentes. Las familias con abundancia relativa mayor al 1% fueron *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Akkermansiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae*, *Prevotellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Helicobacteraceae*, *Atopobiaceae*, *Sutterellaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridium methylpentosum*, *Rikenellaceae*, *Eggerthellaceae* y *Oscillospiraceae*, las cuales tienen cambios tanto de proliferación como de reducción en los diferentes grupos, sobresaliendo los cambios dados conforme avanzaba la infección por *T. crassiceps* (Figura 7). A nivel de géneros, las bacterias que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en los grupos de estudio fueron *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Dubosiella*, *Akkermansia*, *Lachnospira*, *Muribaculum*, *Prevotella*, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Bifidobacterium*, *Ileibacterium*, *Coriobacterium*, *Alloprevotella*, *Muribaculum*, *Parasutterella*, *Prevotellaceae* UCG-001, *Parabacteroides*, *Clostridia*, *Alistipes* y *Oscillospira*, siguiendo un patrón similar a las familias, sobresaliendo los

cambios en los tiempos de infección. En cuanto a los taxones registrados, 18 de ellos presentaron más del 1% de abundancia relativa, dicha abundancia cambia dependiendo el grupo y el tiempo de infección siguiendo patrones similares a los de las familias y géneros registrados ( Figura 8 y 9).

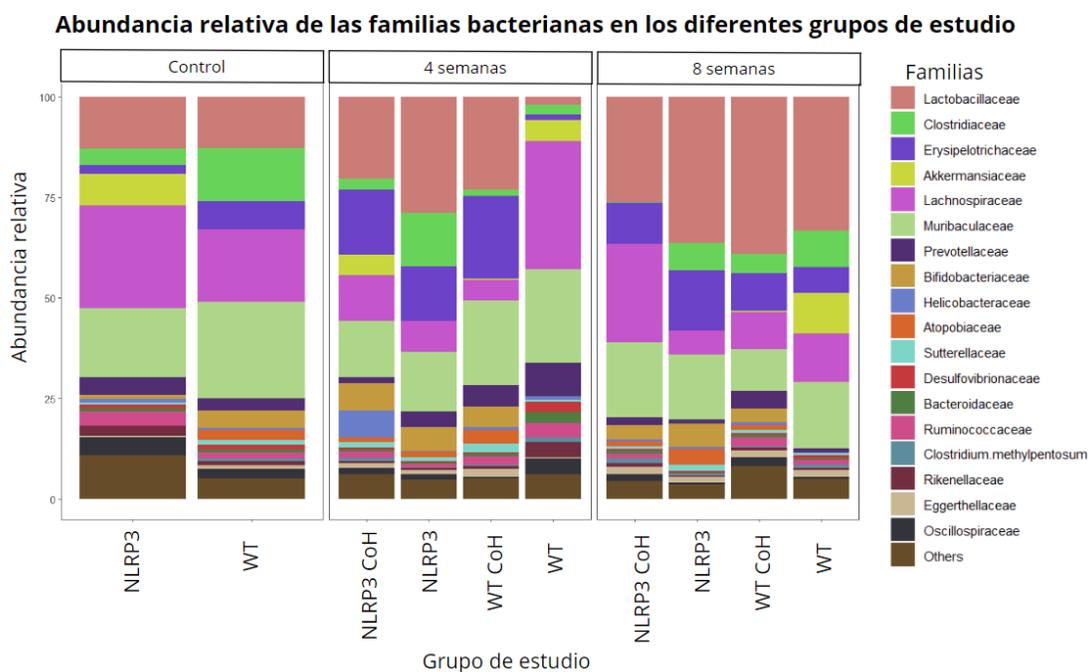


Figura 7. Abundancia relativa de las diferentes familias bacterianas detectadas, seleccionando solo aquellos que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en por lo menos un grupo de estudio.

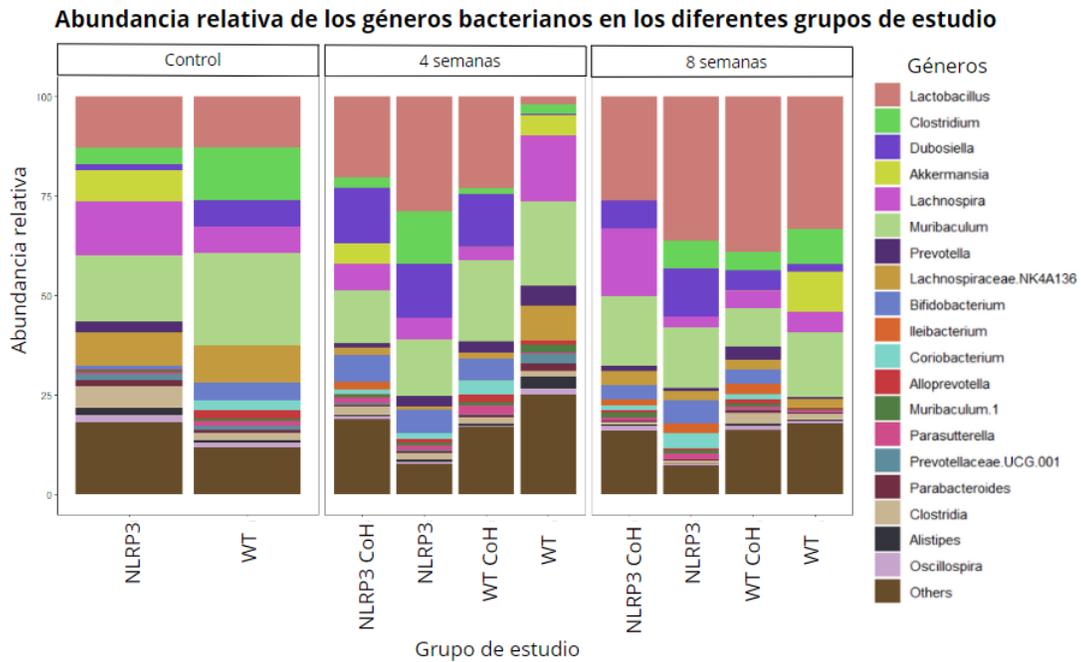


Figura 8. Abundancia relativa de los diferentes géneros bacterianos detectadas, seleccionando solo aquellos que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en por lo menos un grupo de estudio.

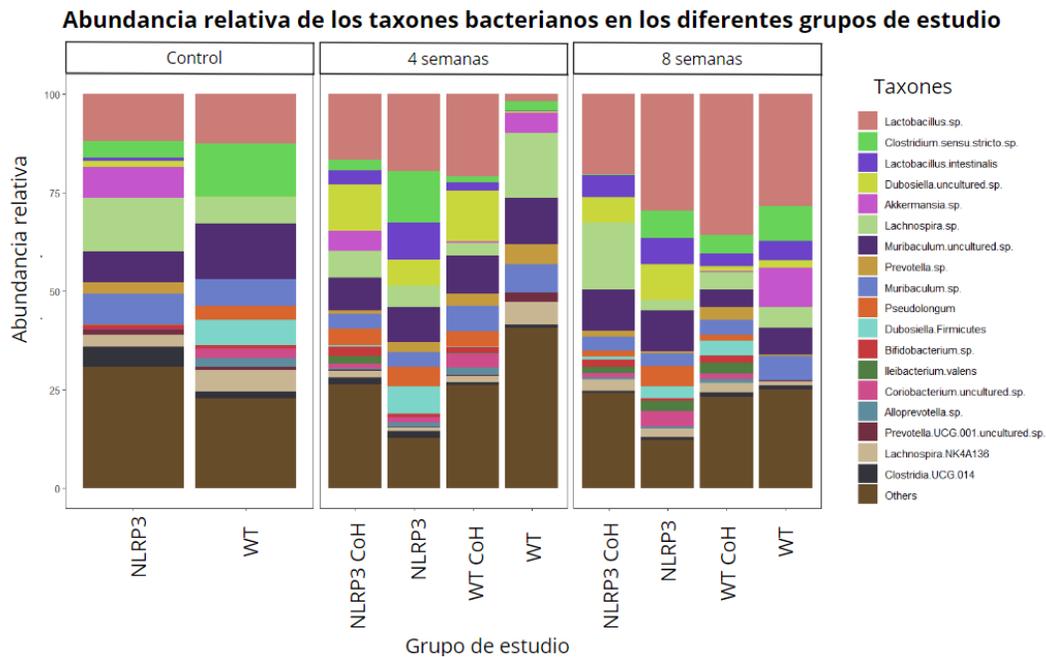


Figura 9. Abundancia relativa de los diferentes taxones bacterianos detectadas, seleccionando solo aquellos que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en por lo menos un grupo de estudio.

Con base a lo anterior se realizaron tablas para simplificar aquellas bacterias que proliferaron y/o aumentaron su abundancia relativa en los diferentes grupos (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Bacterias que aumentaron su abundancia relativa en los diferentes grupos de estudio WT.

Grupo	Familia	Genero	Taxon
WT Control	<i>Muribaculaceae</i>	<i>Muribaculum</i>	<i>Muribaculum uncultured sp.</i>
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pseudolungum</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella firmicutes sp.</i>
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto sp.</i>
WT 4S	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia sp.</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>
	<i>Muribaculaceae</i>	<i>Muribaculum</i>	<i>Muribaculum sp.</i>
WT 8S	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia sp.</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
			<i>Lactobacillus intestinalis</i>
<i>Muribaculaceae</i>	<i>Muribaculum</i>	<i>Muribaculum sp.</i>	
WT 4S CoH	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella sp.</i>
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pseudolongum</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella sp.</i>
WT 8S CoH	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Ileebacterium</i>	<i>Ileebacterium valens</i>
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>

Tabla 3. Bacterias que aumentaron su abundancia relativa en los diferentes grupos de estudio NLRP3 (-/-).

Grupo	Familia	Genero	Taxon
NLRP3 Control	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia sp.</i>
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
	<i>Muribaculaceae</i>	<i>Muribaculum</i>	<i>Muribaculum sp.</i>
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridia UCG_014</i>
	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>
NLRP3 4S	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pseudolongum</i>
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
			<i>Lactobacilus intestinalis</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella uncultured sp.</i>
			<i>Dubosiella firmicutes sp.</i>
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>	
NLRP3 8S	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella uncultured sp.</i>
			<i>Dubosiella firmicutes sp.</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Ilebacterium</i>	<i>Ilebacterium valens</i>
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
			<i>Lactobacilus intestinalis</i>
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pseudolongum</i>	
NLRP3 4S CoH	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia sp.</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Dubosiella</i>	<i>Dubosiella sp.</i>
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pseudolongum</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Ilebacterium</i>	<i>Ilebacterium valens</i>
NLRP3 8S CoH	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>

#### 7.4. Diversidad alfa y análisis de componentes principales.

Se evaluó el índice de la diversidad alfa en los ratones WT y deficientes de NLRP3 en los diferentes tiempos de infección. El índice de Shannon se encontró en un intervalo de entre 4.8 hasta 6.6, indicando una buena diversidad bacteriana, por su parte, las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) mostraron valores mayores a 180, indicando una buena riqueza en las muestras, finalmente el índice de diversidad Filogenética (Faith PD) muestra valores superiores a 10, en todos los índices los ratones WT con microbiota local mostraron una mayor diversidad a las 4 semanas de infección, mientras que los demás grupos mostraron una diversidad similar en cada tiempo (Figura 10).

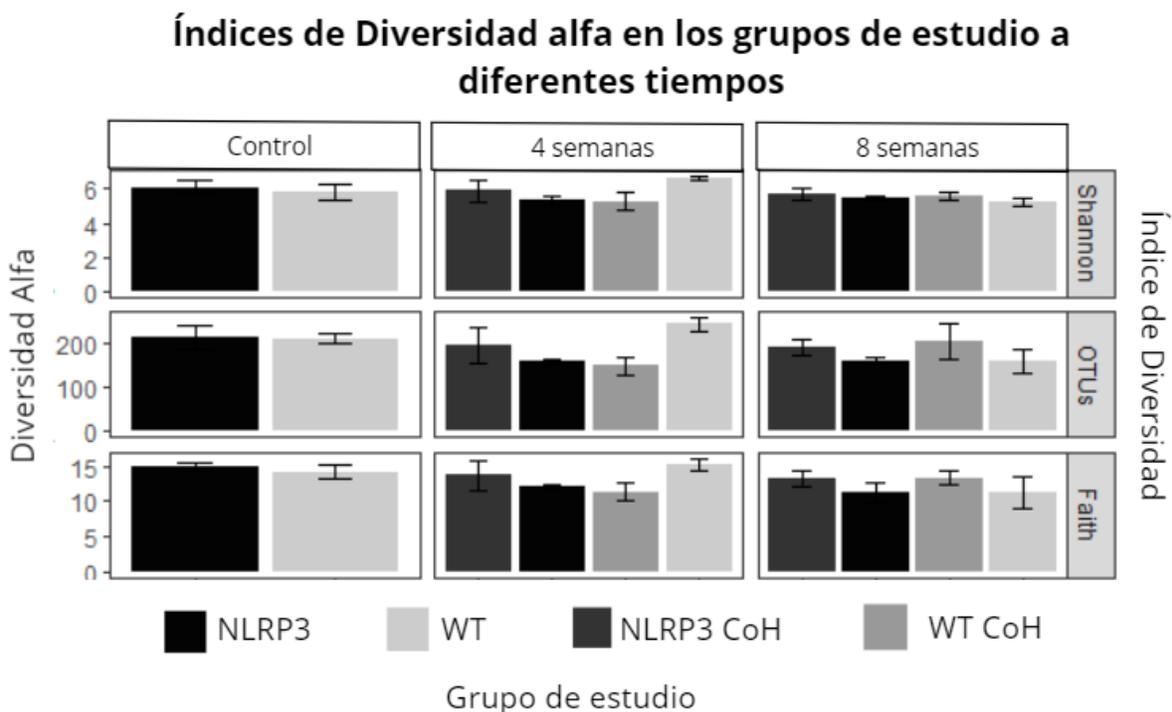


Figura 10. Índices de Diversidad alfa en los diferentes grupos de estudio en el tiempo cero (control), cuatro y ocho semanas.

El análisis de componentes principales (PCA) permitió reducir la dimensionalidad de los datos, facilitando la visualización de cómo se agrupan las muestras en función de sus similitudes o diferencias en cuanto a su composición microbiana, dicho análisis, mostro diferencias en la composición de los géneros microbianos en los

grupos locales, tanto en los controles como en los tiempos de infección, por otro lado, los grupos CoH mostraron similitudes en la composición de su microbiota (Figura 11 y 12).

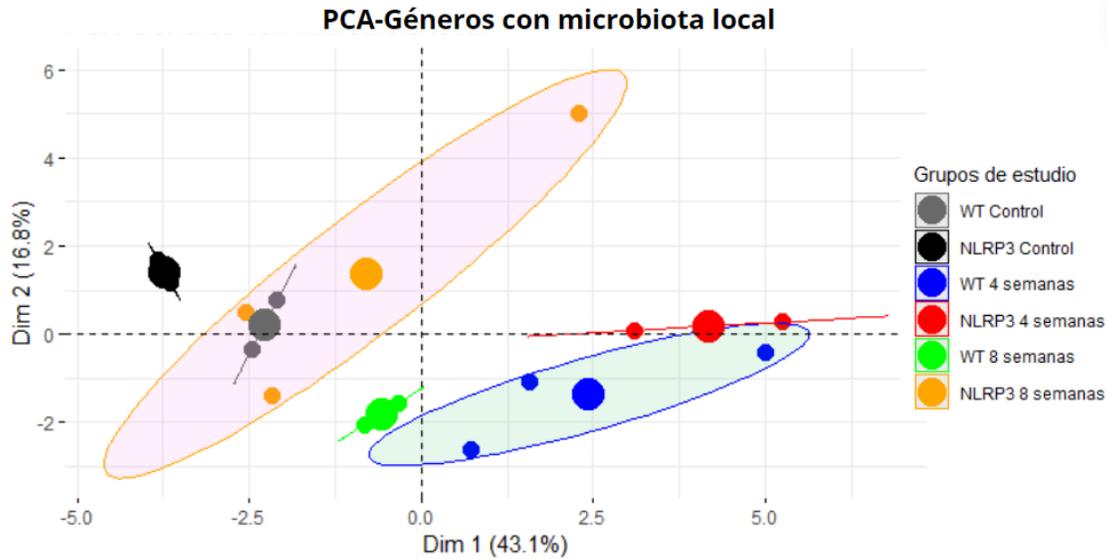


Figura 11. Análisis de componentes principales (PCA) para los diferentes grupos de estudio con microbiota local.

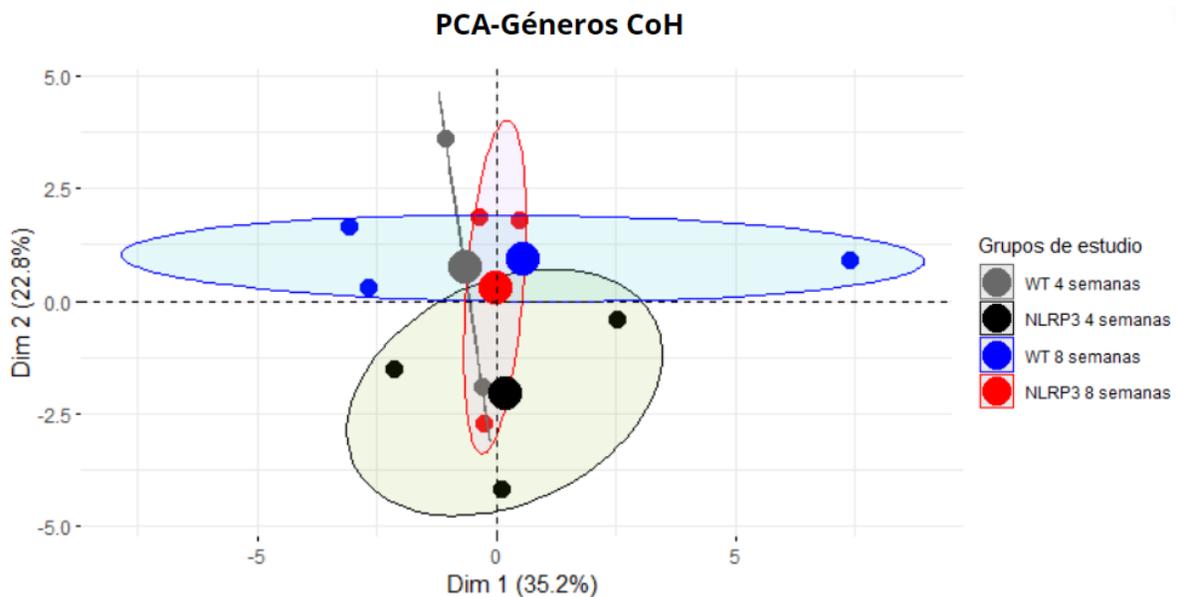
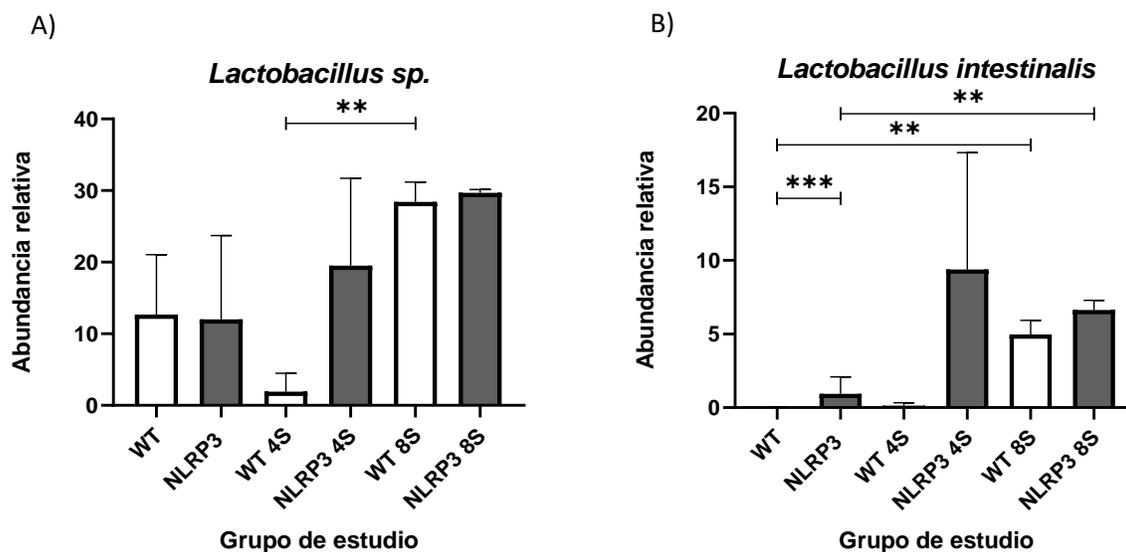


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) para los diferentes grupos de estudio CoH.

## 7.5. Bacterias con diferencias significativas en los diferentes grupos de estudio.

Dentro de los taxones que presentaron diferencias significativas en los grupos de estudio con una microbiota local, dos taxones de *Lactobacillus* presentaron un aumento de abundancia relativa en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> y WT conforme aumentaba la infección, por su parte 2 taxones de *Dubosiella* presentaron una diferencia significativa principalmente en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> en comparación a los WT, siendo estos últimos los que presentaron menor abundancia relativa en todos los tiempos de infección (Figura 13). En otro taxon del género *Muribaculum* se presentaron diferencias significativas en los grupos controles y post infección, reduciendo su abundancia relativa conforme avanzaba la infección principalmente en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup>, contrastando con esto, un taxon del género *Ileibacterium* solo se presentó en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> en las 8 semanas de infección (Figura 14).



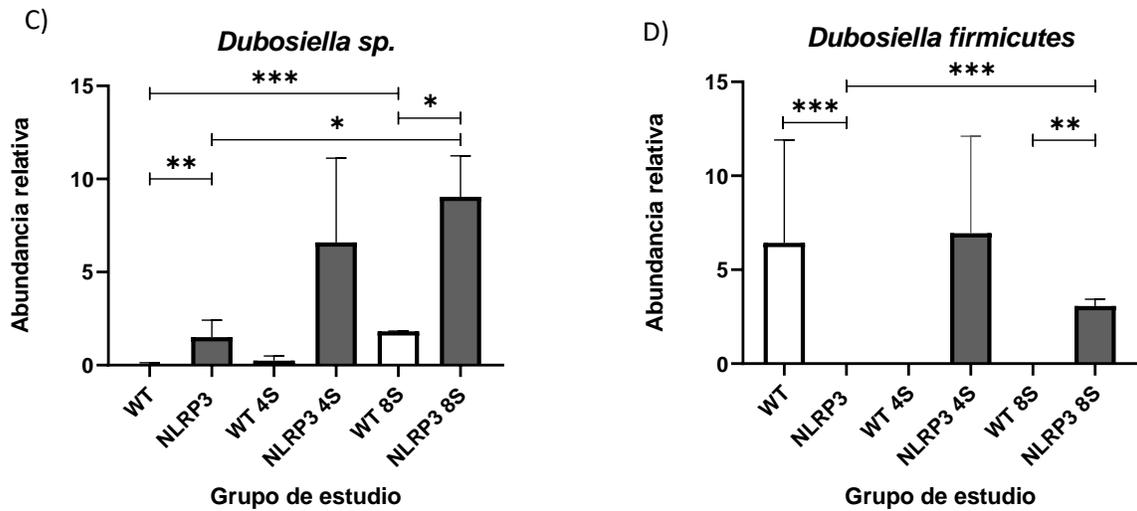


Figura 13. A y B) Abundancia relativa de los taxones del género *lactobacillus* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. C y D) Abundancia relativa de los taxones del género *Dubosiella* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba *t* de student con el programa GraphPad Prism 8.0.1. ( $P < 0.05$ ).

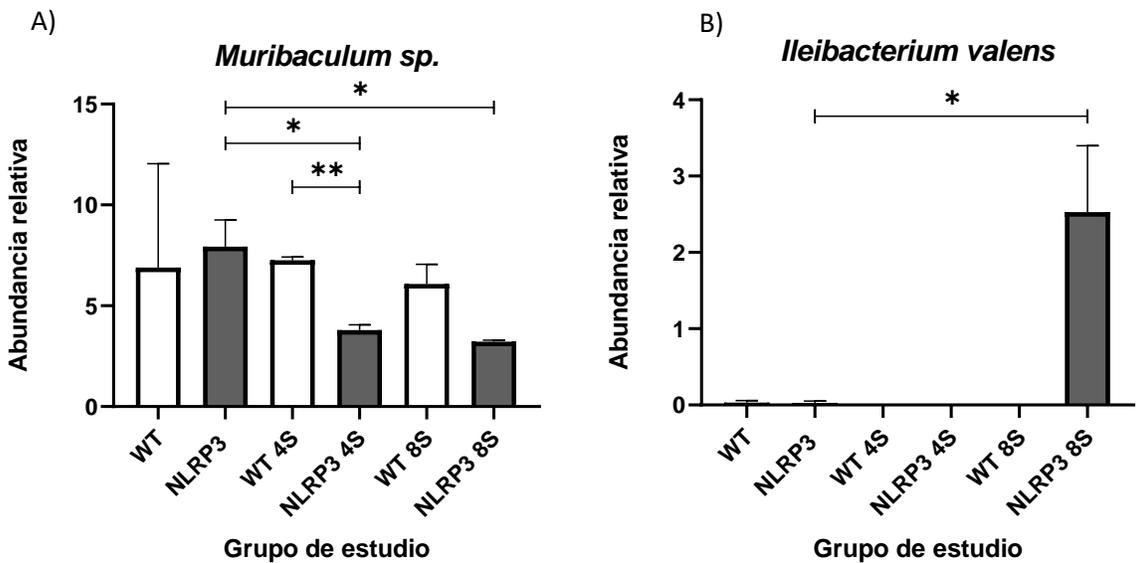


Figura 14. A) Abundancia relativa del taxon para el género *Muribaculum* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. B) Abundancia relativa del taxon para el género *Ileibacterium* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba *t* de student con el programa GraphPad Prism 8.0.1. ( $P < 0.05$ ).

Otros taxones que presentaron diferencias significativas fueron un taxon de los géneros *Prevotella* y *Lachnospira* los cuales presentaron una mayor presencia en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> control, sin embargo, a las 4 semanas de infección, los ratones WT presentaron un aumento drástico, para finalmente reducir su abundancia relativa a las 8 semanas (Figura 15), por su parte un taxon del género *Akkermansia* presento un patrón similar, siendo los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> control los que presentaron mayor abundancia, mientras que en ambos tiempos de infección los papeles se invierten siendo los WT los que presentaron mayor abundancia de estas bacterias, en contraste a esto, un taxon del género *Bifidobacterium* presentó mayor cantidad en los ratones WT control, sin embargo esto cambia en las semanas post infección donde NLRP3<sup>-/-</sup> aumenta la abundancia relativa de este taxon (Figura 16). El último taxon con diferencias significativas en los grupos fue uno del género *Clostridia*, los cuales se presentaron en mayor cantidad en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> post infección (Figura 17).

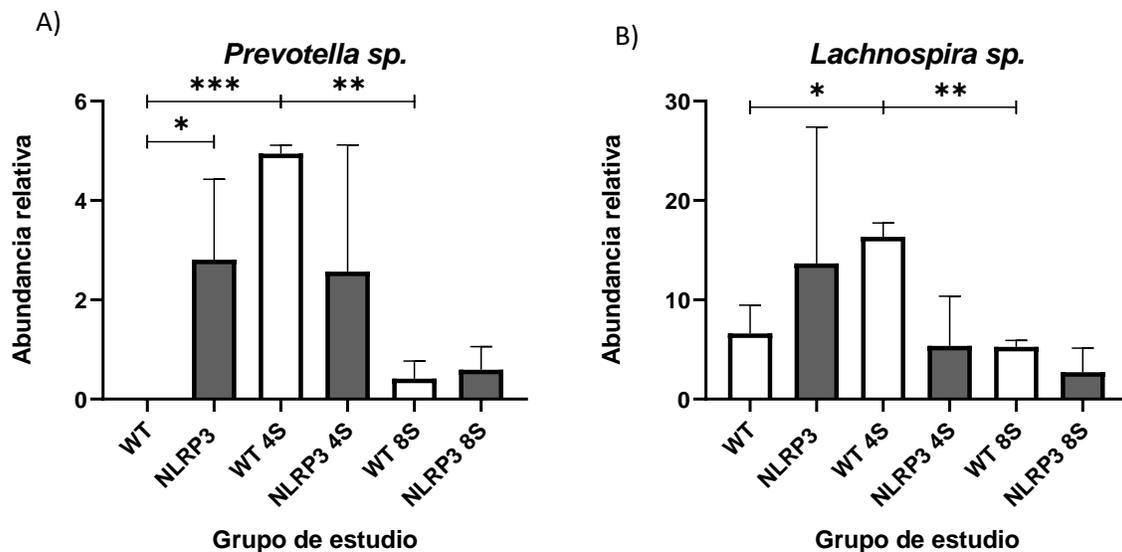


Figura 15. A) Abundancia relativa del taxon para el género *Prevotella* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. B) Abundancia relativa del taxon para el género *Lachnospira* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba *t* de student con el programa GraphPad Prism 8.0.1. (P<0.05).

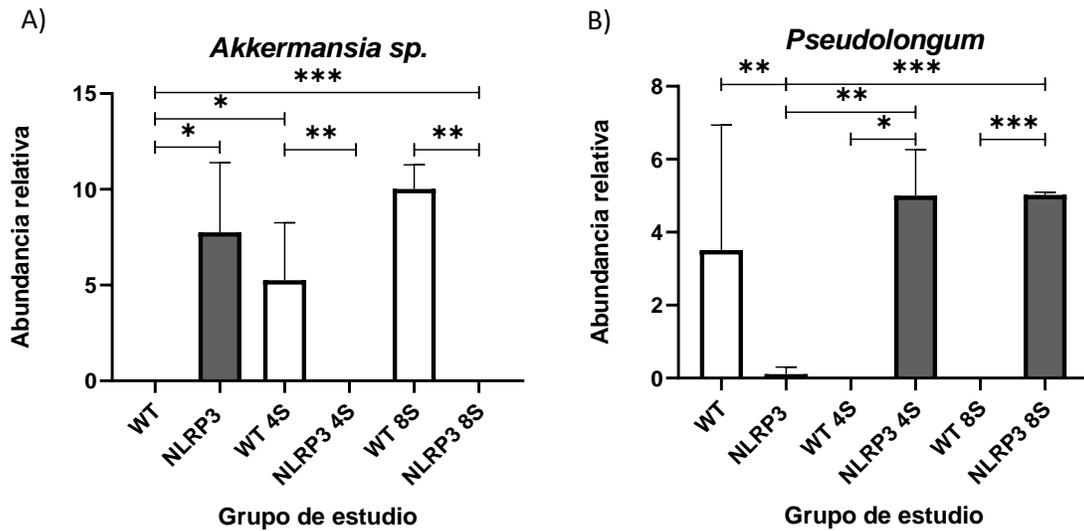


Figura 16. A) Abundancia relativa del taxon para el género *Akkermansia* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. B) Abundancia relativa del taxon para el género *Bifidobacterium* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba *t* de student con el programa GraphPad Prism 8.0.1. ( $P < 0.05$ ).

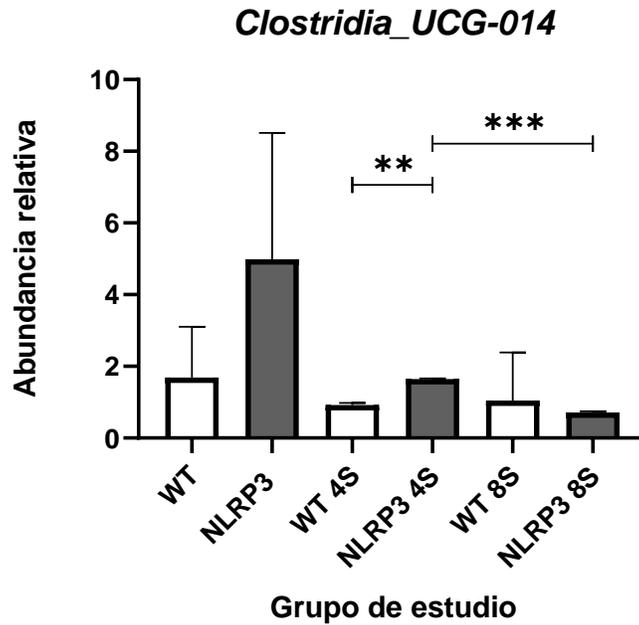
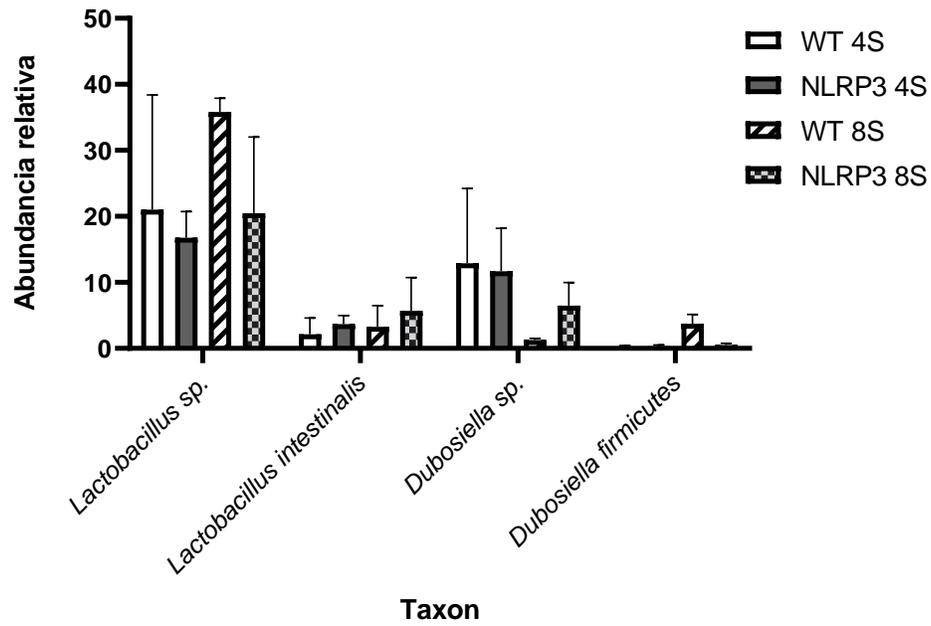


Figura 17. Abundancia relativa del taxon para el género *Clostridia* en los diferentes grupos de estudio con microbiota local. las diferencias significativas se obtuvieron de una prueba *t* de student con el programa GraphPad Prism 8.0.1. ( $P < 0.05$ ).

En cuanto a los grupos CoH, para los taxones anteriormente analizados, se llegó a presentar una proliferación y/o reducción en la abundancia relativa de los diferentes taxones comparándolos con la microbiota local, provocando un cambio en la composición microbiana a pesar de presentar el mismo tiempo de infección que los ratones con microbiota local. (Figura 18).

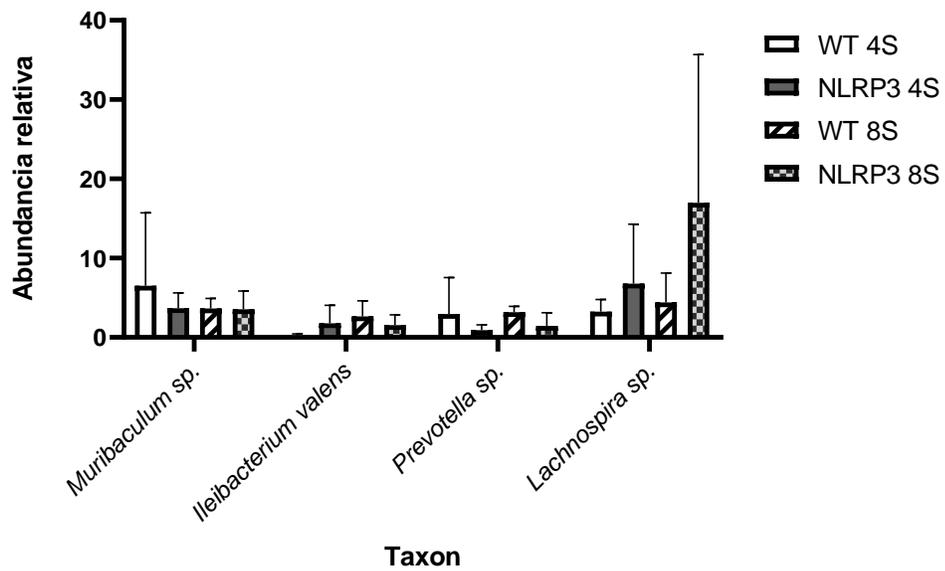
A)

**Taxones de *Lactobacillus* y *Dubosiella* CoH**



B)

**Taxones de *Muribaculum*, *Ileibacterium*, *Prevotella* y *Lachnospira* CoH**



C)

### Taxones de *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Clostridia* CoH

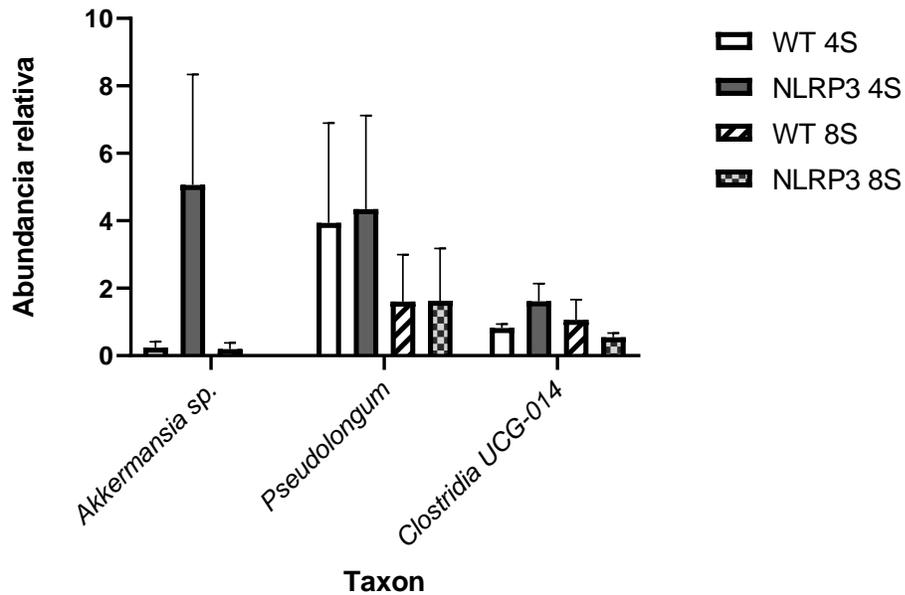


Figura 18. A) Abundancia relativa de los taxones para el género *Lactobacillus* y *Dubosiella* en los grupos CoH. B) Abundancia relativa de los taxones para el género *Muribaculum*, *Ileibacterium*, *Prevotella* y *Lachnospira* en los grupos CoH. C) Abundancia relativa de los taxones para el género *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Clostridia* en los grupos CoH.

Finalmente, el número de metacestodos colectados a las 8 semanas post infección mostro una carga parasitaria menor en los ratones NLRP3, en comparación con los WT, en contraste, en los grupos CoH la carga parasitaria en los WT se redujo significativamente en comparación de los grupos con microbiota local, por su parte, los NLRP3 CoH aumentaron el número de metacestodos (Figura 19).

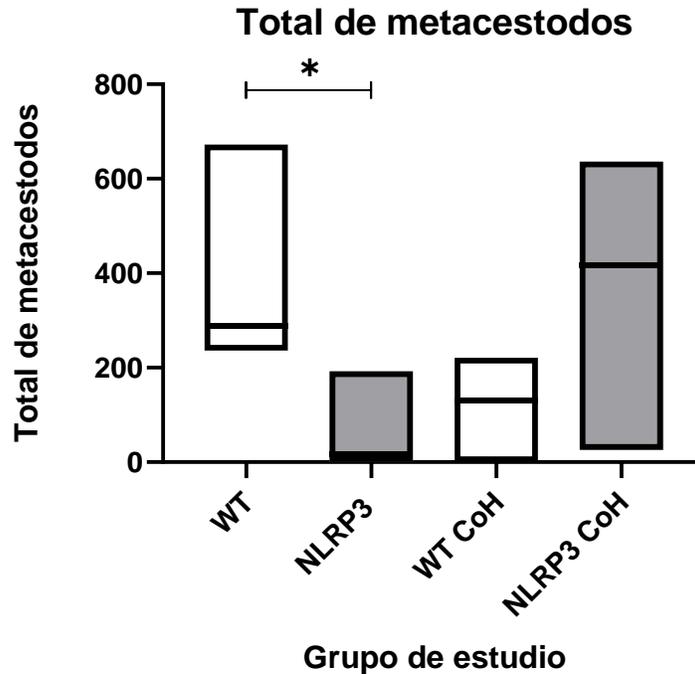


Figura 19. Total de metacestodos recolectados 8 semanas post infección en los diferentes grupos de estudio

## 8. Discusión

En este estudio se determinó la composición de la microbiota bacteriana intestinal para observar su posible influencia en el desarrollo de *T. crassiceps* en ratones deficientes de NLRP3, se observó una clara diferencia en el crecimiento de metacestodos en los diferentes grupos, sugiriendo que los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> presentan una mayor resistencia al parasito, si bien los datos obtenidos no son suficientes para justificar esta posible resistencia, nos da un indicio de los taxones que puede estar influenciándola, así mismo, se muestra un indicativo de cuáles son las bacterias que el parasito podría necesitar y/o utilizar para su desarrollo. De manera general, la composición de la microbiota en los grupos control muestra diferencias entre los ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>, en un estudio del 2010, donde se analizó el papel del inflammasoma NLRP3 en la homeostasis intestinal, se determinó la composición de la microbiota intestinal en ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>, donde se

reportó la presencia de las familias *Streptococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Ruminococcaceae* para WT, en nuestro estudio se encontraron taxones de *Lachnospiraceae* y *Erysipelotrichaceae*, sin embargo, en esta última, el género registrado fue diferente, siendo *Dubosiella*. Por su parte para los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> se registraron las familias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacilaceae*, *Clostridaceae*, *Enterobacteraceae*, *Mycobacteriaceae* y *Burkholderiaceae*, en nuestro grupo NLRP3 control, en la composición bacteriana coincidieron taxones de las familias *Lachnospiraceae*, *Lactobacilaceae* y *Clostridaceae* (Hirota et al. 2010). En otro estudio donde se analizó el papel de la microbiota intestinal en la regulación del comportamiento depresivo en ratones deficientes de NLRP3, se identificaron 120 unidades taxonómicas funcionales (OTUs), en contraste, en este estudio se registraron para NLRP3, 213 OTUs, indicando una mayor cantidad de taxones diferentes registrados. En lo que respecta a la composición, en el estudio de depresión se encontraron las familias *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Coriobacteriaceae*, *Clostridaceae* y *Deferribacteraceae* para el grupo WT, dentro de los resultados obtenidos en este estudio para los WT control, coinciden taxones de *Lachnospiraceae* y *Clostridaceae*, sin embargo el resto de taxones aumentados pertenecen a familias distintas que las reportadas en el estudio de depresión, por otro lado, para los ratones NLRP3, se reportaron familias como *Rikenellaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Prevotellaceae*, *Odoribacteraceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Helicobacteraceae* y *Mycoplasmateceae*, en nuestro respectivo grupo NLRP3 coinciden taxones pertenecientes a la familia *Prevotellaceae* y *Lachnospiraceae* (Zhang et al. 2019). A pesar de presentar diferencias en cuanto a la composición de la microbiota en comparación con otros estudios, existen familias bacterianas que son comunes tanto en ratones WT como deficientes de NLRP3, mostrando así, una clara diferencia en las bacterias intestinales cuando existe una deficiencia de este receptor, dicha disbiosis puede ser explicada por un sistema de  $\beta$ -defensina desregulado en ratones deficientes de NLRP3 siendo este un mediador primario (Petnicki et al. 2009). Este estudio

refuerza el hecho de que el genotipo del huésped juega un papel esencial al determinar la composición de la microbiota intestinal.

De manera específica, los primeros taxones analizados pertenecen al género *Lactobacillus*, las especies pertenecientes a este género se han descrito como un componente subdominante en la microbiota intestinal, adicionalmente a muchas de ellas las han clasificado como probióticos, ya que se han registrados varios beneficios al huésped, como ayuda en la reducción de la obesidad, alivio de la alergia al polen, atenuación de la colitis leve y la modulación de la respuesta inmune innata (Callaghan y Toole 2011) , en este último se ha reportado que especies de *Lactobacillus* como *L. casei* activa células innatas con los marcadores CD-206 y TLR-2, de igual manera se ha reportado que *L. Plantarum*NC8 desempeñan un papel en la diabetes tipo 1 al inhibir el inflamasoma NLRP3 reduciendo el número de células Th1/Th17 en bazo y ganglios linfáticos pancreáticos. (Galdeano y Perdigón 2006 ; Zhang et al. 2023), por otro lado, se ha reportado que ciertas infecciones por helmintos, principalmente nematodos, requieren del género *Lactobacillus* para el mantenimiento exitoso de su ciclo de vida (Reynolds et al., 2014), en este trabajo, el helminto de estudio fue *T. crassiceps*, un parásito biológicamente diferente a los nematodos, por lo que las interacciones de *Lactobacillus* con el organismo podrían ser diferentes, esto se muestra en nuestros resultados, donde los grupos controles presentaron una buena presencia de *Lactobacillus*, sugiriendo que el receptor NLRP3 no interviene en su proliferación, sin embargo a las 4 semanas de infección, estas tienen un aumento en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> y debido a que se conoce que estos son más resistentes a *T. crassiceps*, es probable que estas bacterias tengan un papel importante en dicha resistencia, sin embargo, es desconocido como lo hace o que papel está tomando realmente, debido a que a las 8 semanas su abundancia aumenta en ambos grupos, es probable que el cambio inmunológico de Th1 a Th2, característico en la infección por *T. crassiceps*, este influyendo, por lo que es recomendable realizar estudios enfocados en especies de este género.

Por su parte, el género *Dubosiella* se ha relacionado con diversas enfermedades de manera positiva, ya sea como moduladora en la tolerancia inmune en la colitis, donde se reportó que *Dubosiella newyorkensis*, y su homólogo humano *Clostridium innocuum*, tienen un efecto inmunomodulador probiótico sobre la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Zhang et al. 2024), como protectora en el desarrollo de hígado graso no alcohólico, ya que se registraron efectos hepato-protectores mediados principalmente por *Dubosiella*. (Xiaochun et al. 2023), demostrando que estas bacterias tienen un efecto antiinflamatorio en el huésped. De igual manera se ha reportado que el homólogo de *Dubosiella*, *Clostridium* se encuentra de manera natural en una baja frecuencia (Glendinning, et al.2014), que, al contrario con lo obtenido, el homólogo se encuentra en mayor abundancia en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> control, sugiriendo que la ausencia de NLRP3 permite la proliferación de *Dubosiella*, la cual, aumenta la resistencia contra *T. crassiceps*, sin embargo, los posibles mecanismos por el cual lo hace son desconocidos, por lo que es recomendable realizar más estudios centrados en estas bacterias.

El género *Muribaculum* ha sido poco estudiado en la microbiota intestinal y sus efectos en el hospedador, un estudio reciente, reportó que *Muribaculum intestinale* tiene un efecto descomunal sobre las poblaciones de células T. al inducir de forma robusta la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-23, por lo tanto, se ha asociado con enfermedades inflamatorias intestinales (Bang et al. 2023). En este estudio, a pesar de que la especie de *Muribaculum* no fue identificada, el taxon registrado presentó una reducción en la abundancia relativa en los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> conforme avanzaba la infección, mientras que en los ratones WT se mantuvo, es probable, que *T. crassiceps* requiera de esta bacteria para proliferar dentro del huésped, quizá se beneficie por el perfil inflamatorio que la bacteria produce o algún otro efecto de las citocinas cuya producción aumenta debido a la bacteria, sin embargo, los datos actuales no son suficientes para poder confirmarlo. Por su parte, el género *Ileibacterium* ha sido implicado en la obesidad y la inflamación intestinal inducidas por microbios mediante una producción de citocinas interleucina-17 (IL-17) y péptidos antimicrobianos, así mismo, se ha reportado que en modelos murinos con adenocarcinoma, sugiere que la especie

*Ileibacterium valens* puede promover crecimiento tumoral, por otro lado, *Ileibacterium massiliense* fue aislada del íleon de un paciente con enfermedad de Crohn, reafirmando su papel inflamatorio (Mailhe et al. 2016 ; Fu et al. 2023). En los resultados obtenidos, *Ileibacterium* solo llegó a aparecer de forma significativa en las 8 semanas post infección, sugiriendo que esta prolifera con la infección, sin embargo su relación directa no es posible de descifrar.

En una revisión de casos de infección por helmintos se compararon los microbiomas presentes, en la cual se menciona que la alteración del microbioma así como el tipo de interacción que se tenga con las bacterias que lo conforman va depender mucho del tipo de helminto parasitario que esté actuando, por ejemplo, en una infección con *Enterobius*, la carga parasitaria se asoció negativamente con *Prevotellaceae* sp., en contraste, la infección por *Trichuris* se asoció de manera positiva con varias bacterias de la misma familia. (Kupritz et al. 2021). Así mismo en un estudio donde se analizó la microbiota en ratones deficientes del receptor NLRP6 reportaron cambios tanto cuantitativos como cualitativos en numerosos taxones, incluida una mayor representación de miembros de *Prevotellaceae* y *TM7* (Elinav et al.2011), lo cual concuerda con lo obtenido en los controles, donde NLRP3<sup>-/-</sup> muestra mayor abundancia de esta familia, sin embargo esto cambia en las 4 semanas de infección con *T. crassiceps*, donde los WT aumentan la abundancia de esta taxa incluso superando a los deficientes de NLRP3, sin embargo, para la semana 8 se da una reducción de la abundancia relativa, esto podría indicar que el parasito requiere a la bacteria para su crecimiento, pero solo durante su primera etapa (4 semanas), característica por una respuesta Th1, sin embargo, la influencia que *Prevotellaceae* tenga sobre *T. crassiceps* no es clara, por tanto es recomendable realizar estudios enfocados en diversas especies pertenecientes a esta familia.

Los taxones pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae* se han relacionado con diferentes enfermedades, sin embargo, aún no se ha confirmado un papel activo o pasivo en dichas patologías, aunque diferentes géneros y especies de esta familia se incrementan en enfermedades como la obesidad, diabetes, enfermedades hepáticas y las enfermedades intestinales inflamatorias, además, parecen estar

involucradas en los síndromes depresivos y el síndrome de esclerosis múltiple, no se conoce su papel en dichas enfermedades, contrario a lo anterior, se ha reportado que las bacterias intratisulares de la familia *Lachnospiraceae* facilitan la función de vigilancia inmunitaria de las células T CD8<sup>+</sup> y controlan la progresión del cáncer colorrectal (Vaca et al. 2020 ; Zhang et al. 2023). A pesar de lo anterior, los estudios sobre el papel de la familia *Lachnospiraceae* en infecciones por helmintos es escasa, en los resultados obtenidos, se registró un patrón similar que el taxon de *Prevotella*, teniendo un aumento a las 4 semanas post infección, para posteriormente tener un descenso a las 8 semanas, indicando una posible influencia del cambio de respuesta inmune que afecta a la bacteria y/o el parasito influye en su proliferación y reducción para su beneficio, sin embargo, los datos no permiten confirmar lo antes mencionado, por tanto, es recomendable analizar la influencia de estas bacterias en los cambios inmunológicos.

Se ha reportado que las bacterias del género *Akkermansia* tienen una fuerte asociación con la infección por helmintos, esto debido a que presentan un aumento en infecciones de helmintos gastrointestinales, principalmente nematodos, adicionalmente se ha reportado que la inducción de macrófagos activados alternativamente (M2) y una mayor secreción de moco intestinal provocada por helmintos pueden aumentar la abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Kupritz et al. 2021 ; Wang et al. 2024). En cuanto a los efectos que las bacterias tienen sobre los parásitos, se ha determinado una relación positiva entre la colonización de *A. muciniphila* y la restricción de la infección por helmintos, esto relacionado con una mejoría en la secreción de moco intestinal, sin embargo, esto solo se ha presentado en infecciones con helmintos nematodos intestinales (Jin et al. 2022). En este caso, el parasito de estudio es un parasito que se desarrolla en la cavidad peritoneal, por tanto, el efecto que estas bacterias podrían presentar en el parasito es desconocido, por otro lado, la abundancia relativa registrada para el taxon de *Akkermansia* presente en este estudio, mostro un aumento significativo en las 4 y 8 semanas de infección en los grupos WT, lo cual concuerda con lo reportado, pudiendo asociarlo al aumento de M2 característico de la infección, en contraste, los grupos NLRP3 presentaron una reducción en las semanas de infección, esto podría explicarse a la

baja y/o nula población de M2 que se presenta por la infección en ratones NLRP3<sup>-/-</sup> (Flores et al. 2024).

Las especies del género *Bifidobacterium* son los probióticos más importantes en el cuerpo humano y desempeñan un papel crucial en la prevención de la invasión de patógenos, el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa, el fortalecimiento de la integridad intestinal y la regulación de la inmunidad del huésped (Hill et al. 2014), también se han atribuido propiedades supresoras para el carcinoma hepatocelular asociado a la enfermedad del hígado graso no alcohólico, así como propiedades protectoras contra enfermedades inflamatorias intestinales (Song et al. 2023 ; Yao et al. 2021). En el estudio presente, en los grupos controles solo se presentó en mayor cantidad en el grupo WT, conforme avanzaba la infección, la abundancia cambio siendo los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> los que presentaron un aumento de abundancia relativa significativo, debido a las propiedades atribuidas a las especies de *Bifidobacterium*, es probable que la respuesta inmune que se genera gracias a la ausencia de NLRP3 ayude a la proliferación de *Pseudolongum*, y a su vez, este taxon ayuda a la resistencia contra *T. crassiceps*, sin embargo, esto no puede ser confirmado con los resultados actuales.

EL género *Clostridium* forma del 10 al 40% de la microbiota intestinal, así mismo, dichas especies pertenecientes al género se han descrito como miembros inmunomoduladores de la microbiota, ya que poseen una actividad metabólica capaz de conferir resistencia a la colonización contra patógenos, por su parte, se han reportado especies patógenas que llegan a alterar la respuesta inmunitaria, sin embargo el papel o características del taxon significativo encontrado en este trabajo no se han determinado (Back et al. 2008 ; Stefka et al. 2014). En el caso de las infecciones por helmintos, se ha relacionado fuertemente la presencia de *Clostridia* (Beyhan y Yıldız 2023)., sin embargo esto solo se ha estudiado en parásitos nematodos, por lo que el papel que toma en infecciones por cestodos como *T. crassiceps* es desconocido. En los resultados obtenidos en este estudio, se muestra una diferencia significativa a las 4 semanas de infección siendo los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> los que presentaron mayor abundancia, pudiendo sugerir, que estas bacterias

ayudan de alguna manera a la resistencia en esta fase de la infección, sin embargo, faltan estudios para comprender mejor la relación de *clostridium* con la infección y el inflamasoma NLRP3.

Con respecto a los grupos CoH, estos presentaron una microbiota muy similar, mientras que en el conteo de los metacestodos al comparar los grupos CoH con los que tuvieron una microbiota local, se presentó una reducción en la carga parasitaria para los grupos WT, pudiendo indicar que por hábitos coprofágicos los ratones pudieron obtener la microbiota necesaria para resistir la infección, en contraste, el grupo NLRP3<sup>-/-</sup> reflejó un mayor número de parásitos en los CoH, indicando una posible adquisición de susceptibilidad por parte de las bacterias adoptadas. Algo similar se reportó en un proyecto donde se midió la microbiota de 2 grupos con una dieta diferente, al realizar CoH, los grupos no solo presentaron una microbiota similar, sino que también adoptaron fenotipos similares (Ridaura et al. 2013).

## 9. Conclusión

Los resultados de este estudio nos mostraron que la ausencia del receptor NLRP3 tiene una influencia en la composición de la microbiota bacteriana intestinal, la cual puede ayudar en la resistencia contra una infección de *T. crassiceps*, el cual coloniza específica y permanentemente a la cavidad peritoneal, así mismo, se muestra que el parásito tiene un papel en el cambio de dicha composición, de manera que podría ayudar al establecimiento y/o proliferación del helminto, sin embargo los datos obtenidos no son suficientes para poder asegurarlo, por lo que es recomendable realizar estudios más profundos enfocados en los diferentes taxones encontrados y su influencia en la respuesta inmune y en *T. crassiceps*.

## 10. Referencias

- Alhallaf, R.; Agha, Z.; Miller, C.M.; Robertson, A.A.B.; Sotillo, J.; Croese, J.; Cooper, M.A.; Masters, S.L.; Kupz, A.; Smith, N.C.; et al. (2018). The NLRP3 Inflammasome Suppresses Protective Immunity to Gastrointestinal Helminth Infection. *Cell Rep*, 23, 1085-1098, doi:10.1016/j.celrep.2018.03.097.
- Allen, IC; Remar, MA; Moore, CB; Holl, EK; McElvania-TeKippe, E.; Recaudador de impuestos, DJ; Guthrie, EH; Encurtidos, RJ; Ting, JP-Y. (2009). El inflammasoma NLRP3 media la inmunidad innata in vivo al virus de la influenza A mediante el reconocimiento del ARN viral. *Inmunidad*, 30 , 556– 565.
- Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R, Huffnagle GB, Noverr MC. (2008). GI Microbiota and Regulation of the Immune System. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer.
- Bandyopadhyay, S., Lane, T., Venugopal, R., Parthasarathy, PT., Cho, Y., Galam, L., et al. (2013). MicroRNA-133a-1 regulates inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 439(3):407–12.
- Bang S, Shin YH, Ma X, Park SM, Graham DB, Xavier RJ, Clardy J. A. (2023). Cardiolipin from *Muribaculum intestinale* Induces Antigen-Specific Cytokine Responses. *J Am Chem Soc*. 2023 Nov 1;145(43):23422-23426. doi: 10.1021/jacs.3c09734. Epub Oct 23. PMID: 37871232; PMCID: PMC10623554.
- Besnard AG, Guillou N, Tschopp J, Erard F, Couillin I, Iwakura Y, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D. (2011). NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy*. 2011 Aug;66(8):1047-57. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02586.x. PMID: 21443539.
- Beyhan YE, Yıldız MR. (2023). Microbiota and parasite relationship. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023 Aug;106(4):115954. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.115954. Epub Apr 20. PMID: 37267741.
- Buevas, N. y Suárez, Janis. (2015). Regulación del inflammasoma NLRP3: bioquímica y más allá de ella. *Iatreia*, 28(2), 170-178. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n2a07>.

-Castañeda, M. (2016). Identificación de los productos de excreción y secreción del cisticero de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras [Tesis de Licenciatura.]. Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas.

-Cayrol C. y Girard JP. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 106(22):9021-6. doi: 10.1073/pnas.0812690106. Epub 2009 May 13. PMID: 19439663; PMCID: PMC2690027.

-Chenery, A.L.; Alhallaf, R.; Agha, Z.; Ajendra, J.; Parkinson, J.E.; Cooper, M.M.; Chan, B.H.K.; Eichenberger, R.M.; Dent, L.A.; Robertson, A.A.B.; et al. (2019). Inflammasome-Independent Role for NLRP3 in Controlling Innate Antihelminth Immunity and Tissue Repair in the Lung. *J Immunol*, 2724-2734, 593 doi:10.4049/jimmunol.1900640.

-Cheng, H., Ning, M., Chen, D., Ma, W. (2019). Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. *Frontiers in Immunology*. Volume 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00607. ISSN=1664-3224.

- Duncan, S., Lobley, G., Holtrop, G. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*, 32, pp. 1720-1724.

Eckburg PB., Bik EM., Bernstein CN., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill SR., Nelson KE., Relman DA. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. Jun 10;308(5728):1635-8. doi: 10.1126/science.1110591. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831718; PMCID: PMC1395357.

-Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Flavell, R. A. (2011). NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell*, 145(5), 745–757. doi:10.1016/j.cell.2011.04.022.

-Fekete E, Allain T, Siddiq A, Sosnowski O, Buret AG. (2020). *Giardia* spp. and the Gut Microbiota: Dangerous Liaisons. *Front Microbiol*. Jan 12;11:618106. doi: 10.3389/fmicb.2020.618106. PMID: 33510729; PMCID: PMC7835142.

-Flores-Sotelo I, Juárez N, González MI, Chávez A, Vannan DT, Eksteen B, Terrazas LI, Reyes JL. (2024). Endogenous innate sensor NLRP3 is a key component in peritoneal macrophage dynamics required for cestode establishment. doi: 10.1007/s12026-024-09496-3. Epub ahead of print. PMID: 38842647.

-Fullard, N. y O'Reilly, S. (2015). Papel del sistema inmunológico innato en la esclerosis

sistémica. *Semin. Inmunopatol.* 37, 511–517. doi: 10.1007/s00281-015-0503-7.

- Fu J. y Wu H. (2023). Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu Rev Immunol.* 41:301-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36750315; PMCID: PMC10159982.

-Fu T, Huan T, Rahman G, Zhi H, Xu Z, Oh TG, Guo J, Coulter S, Tripathi A, Martino C, McCarville JL, Zhu Q, Cayabyab F, Low B, He M, Xing S, Vargas F, Yu RT, Atkins A, Liddle C, Ayres J, Raffatellu M, Dorrestein PC, Downes M, Knight R, Evans RM. (2023). Paired microbiome and metabolome analyses associate bile acid changes with colorectal cancer progression. *Cell Rep.* 2023 Aug 29;42(8):112997. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112997.

- Galdeano CM. y Perdigón G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Feb;13(2):219-26. doi: 10.1128/CVI.13.2.219-226.2006. PMID: 16467329; PMCID: PMC1391937.

-Glendinning, L., Nausch, N., Free, A., Taylor, D. W., & Mutapi, F. (2014). The microbiota and helminths: sharing the same niche in the human host. *Parasitology*, 141(10), 1255-1271. doi:10.1017/s0031182014000699.

-Hayes, K.S.; Bancroft, A.J.; Goldrick, M.; Portsmouth, C.; Roberts, I.S.; Grencis, R.K. (2010). Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Science*, 328, 1391–1394.

-Hernández, J. y Urcuqui, S. (2012). Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*, 25(4), 380-390. ISSN 0121-0793.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24912386.

-Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, Lam V, Potentier MS, Ng K, Bawa M, McCafferty DM, Rioux KP, Ghosh S, Xavier RJ, Colgan SP, Tschopp J, Muruve D, MacDonald JA, Beck PL. (2010). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jun;17(6):1359-72. doi: 10.1002/ibd.21478. Epub 2010 Sep 24. PMID: 20872834; PMCID: PMC3026862.

- Houlden, A.; Hayes, K.S.; Bancroft, A.J.; Worthington, J.J.; Wang, P.; Grencis, R.K.; Roberts, I.S. (2015). Chronic *Trichuris muris* infection in C57BL/6 mice causes significant changes in host microbiota and metabolome: Effects reversed by pathogen clearance. *PLoS ONE*, 10, e0125945.
- Icaza-Chavez, M. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 78, 4 ; 240-248. <https://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-microbiota-intestinal-salud-enfermedad-articulo-S0375090613001468>
- Jin, X.; Bai, X.; Yang, Y.; Ding, J.; Shi, H.; Fu, B.; Boireau, P.; Liu, M.; Liu, X. (2020). NLRP3 played a role in *Trichinella spiralis*-triggered Th2 and regulatory T cells response. *Vet Res*, 51, 107, doi:10.1186/s13567-020-00829-2.
- Jin X, Liu Y, Wang J, Wang X, Tang B, Liu M, Liu X.  $\beta$ -Glucan-triggered *Akkermansia muciniphila* expansion facilitates the expulsion of intestinal helminth via TLR2 in mice. (2022). *Carbohydr Polym*. Jan 1;275:118719. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118719. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34742442.
- Kupritz J, Angelova A, Nutman TB, Gazzinelli-Guimaraes PH.(2021). Helminth-Induced Human Gastrointestinal Dysbiosis: a Systematic Review and Meta-Analysis Reveals Insights into Altered Taxon Diversity and Microbial Gradient Collapse. *mBio*. Dec 21;12(6):e0289021. doi: 10.1128/mBio.02890-21. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34933444; PMCID: PMC8689561.
- Lescano, A. y Zunt, J. (2013). Chapter 27 - Other cestodes: sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis. Editor(s): Hector H. Garcia, Herbert B. Tanowitz, Oscar H. Del Brutto, *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, Volume 114, Pages 335-345, ISSN 0072-9752, ISBN 9780444534903.
- Lee, S.C.; Tang, M.S.; Easton, A.V.; Devlin, J.C.; Chua, L.L.; Cho, I.; Moy, F.M.; Khang, T.F.; Lim, Y.A.L.; Loke, P.N. (2019). Linking the effects of helminth infection, diet and the gut microbiota with human whole-blood signatures. *PLoS Pathog*, 15, 1–30.
- Llinás-Caballero K y Caraballo L. (2022). Helminths and Bacterial Microbiota: The Interactions of Two of Humans' "Old Friends". *Int J Mol Sci*. Nov 1;23(21):13358. doi: 10.3390/ijms232113358. PMID: 36362143; PMCID: PMC9658883.

- Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, Lagier JC, Fournier PE, Raoult D. (2016). 'Ileibacterium massiliense' gen. nov., sp. nov., a new bacterial species isolated from human ileum of a patient with Crohn disease. *New Microbes New Infect.* 2016 Nov 28;17:25-26. doi: 10.1016/j.nmni.2016.11.022. PMID: 28275435.
- Maizels, RM., Balie, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, MD., Allen, JE. (2004). Helminth parasites—masters of regulation. *Immunol Rev* ; 201 : 89-116.
- McIntire, C.R., Yeretssian, G., Saleh, M. (2009). Inflammasomes in infection and inflammation. *Apoptosis* **14**, 522–535. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0312-3>.
- Montaño, L., Fortoul, T., Redón E. (2017). ¿Qué son los inflamosomas? El NLRP3 como por ejemplo. *Rev. Fac. Med. (Méx.)* vol.60 no.1 Ciudad de México ene./feb. 2017. ISSN 0026-1742
- Morales, J., Escobedo, G., Vargas-Villavicencio, JA., Larralde, C. (2008). The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cysticercosis. *Curr Top Med Chem* ; 8(5):400-7. doi: 10.2174/156802608783790866. PMID: 18393903.
- O'Callaghan, J., O'Toole, PW (2011). *Lactobacillus* : relaciones entre el huésped y el microbio. En: Dobrindt, U., Hacker, J., Svanborg, C. (eds.) *Entre la patogenicidad y el comensalismo. Temas actuales en microbiología e inmunología*, vol. 358. Springer, Berlín, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_187](https://doi.org/10.1007/82_2011_187)
- O'Hara, A. y Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO J*, 7 (2006), pp. 688-693.
- Ostoa-Saloma, P., Ostoa-Jacobo, P., Esquivel-Velázquez, M., Bazúa, S., Larralde, C. (2010). Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:510978. doi: 10.1155/2010/510978. PMID: 20168999; PMCID: PMC2822235.
- Ozaki, E., Campbell, M. y Doyle, SL (2015). Dirigirse al inflamasoma NLRP3 en enfermedades inflamatorias crónicas: perspectivas actuales. *J. Inflamm. Res.* 8, 15-27. doi: 10.2147/JIR.S51250.
- Petnicki-Ocwieja T, Hrcir T, Liu YJ, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the

intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;106(37):15813-8. doi: 10.1073/pnas.0907722106. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19805227; PMCID: PMC2747201.

-Rapin, A.; Chuat, A.; Lebon, L.; Zaiss, M.M.; Marsland, B.J.; Harris, N.L. (2020). Infection with a small intestinal helminth, *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, consistently alters microbial communities throughout the murine small and large intestine. *Int. J. Parasitol.* 50, 35–46.

-Rausch, S.; Midha, A.; Kuhring, M.; Affinass, N.; Radonic, A.; Kühl, A.A.; Bleich, A.; Renard, B.Y.; Hartmann, S. (2018). Parasitic Nematodes Exert Antimicrobial Activity and Benefit from Microbiota-Driven Support for Host Immune Regulation. *Front. Immunol.* 9, 2282.

-Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. (2011). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* Apr;2(4):361-7. doi: 10.1038/86373. PMID: 11276208.

- Reyes, J.L., (2011). Inmunoregulaci3n por el c3stodo *Taenia crassiceps* y su efecto sobre el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico, Facultad de Medicina.

-Ridaura, V. et al. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* 341, 1241214. DOI:10.1126/science.124121.

-Schroder, K. y Tschopp, J. (2010). Los inflamasomas. *Celda* 140, 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.

-Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18143-51. doi: 10.1074/jbc.M109.004804. Epub May 5. PMID: 19416975; PMCID: PMC2709345.

-Song Q, Zhang X, Liu W, Wei H, Liang W, Zhou Y, Ding Y, Ji F, Ho-Kwan Cheung A, Wong N, Yu J. (2023). *Bifidobacterium pseudolongum*-generated acetate suppresses non-alcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2023 Dec;79(6):1352-1365. doi: 10.1016/j.jhep.2023.07.005. Epub Jul 17. PMID: 37459922.

- Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, Tjota MY, Seo GY, Cao S, Theriault BR, et al. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 13145–13150. 10.1073/pnas.1412008111.
- Takeuchi, O.; Akira, S. (2010). Receptores de reconocimiento de patrones e inflamación. *Celda*, 140 , 805–820. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Terrazas, LI., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* ; 84: 74-81.
- Thomas, PG; Dash, P.; Aldridge, JR; Ellebedy, AH; Reynolds, C.; Funk, AJ; Martín, WJ; Lamkanfi, M.; Webby, RJ; Boyd, KL; (2009). El sensor intracelular NLRP3 media respuestas clave innatas y curativas al virus de la influenza A mediante la regulación de la caspasa-1. *Inmunidad*, 30 , 566– 575.
- Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*. (2020). Apr 15;8(4):573. doi: 10.3390/microorganisms8040573. PMID: 32326636; PMCID: PMC7232163.
- Valdor, R. (2012). *Autophagy and the regulation of the immune response*. New York, Bronx, United Estate of America.
- Wang J, Zhao X, Li X, Jin X. (2024). *Akkermansia muciniphila*: a deworming partner independent of type 2 immunity. *Gut Microbes*. Jan-Dec;16(1):2338947. doi: 10.1080/19490976.2024.2338947. Epub 2024 May 8. PMID: 38717824; PMCID: PMC11086001.
- Wünschmann A, Garlie V, Averbek G, Kurtz H, Hoberg EP. (2003). Cerebral Cysticercosis by *Taenia Crassiceps* in a Domestic Cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. ;15(5):484-488. doi:[10.1177/104063870301500517](https://doi.org/10.1177/104063870301500517).
- Xiaochun Ye, Peng Sun, Shuaiwei Lao, Meiyun Wen, Ruofang Zheng, Yuanyuan Lin, Lipeng Gan, Xia Fan, Ping Wang, Zhiyong Li, Xiaoqing Yan, Longwei Zhao. (2023). Fgf21-Dubosiella axis mediates the protective effects of exercise against NAFLD development. *Life Sciences*, Volume 334, 122231, ISSN 0024-3205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122231>.

- Yao S, Zhao Z, Wang W, Liu X. (2021). Bifidobacterium Longum: Protection against Inflammatory Bowel Disease. J Immunol Res. Jul 23;2021:8030297. doi: 10.1155/2021/8030297. PMID: 34337079; PMCID: PMC8324359.
- Zhang X, Yu D, Wu D, Gao X, Shao F, Zhao M, Wang J, Ma J, Wang W, Qin X, Chen Y, Xia P, Wang S. (2023). Tissue-resident Lachnospiraceae family bacteria protect against colorectal carcinogenesis by promoting tumor immune surveillance. Cell Host Microbe. 2023 Mar 8;31(3):418-432.e8. doi: 10.1016/j.chom.01.013. PMID: 36893736.
- Zhang Y, Li Y, Wang X, Huang J, Feng X, Shi C, Yang W, Jiang Y, Cao X, Wang J, Huang H, Zeng Y, Wang N, Yang G, Wang C. (2023). Lactobacillus Plantarum NC8 and its metabolite acetate alleviate type 1 diabetes via inhibiting NLRP3. Microb Pathog. 2023 Sep;182:106237. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106237. Epub Jul 6. PMID: 37422174.
- Zhang Y, Huang R, Cheng M, Wang L, Chao J, Li J, Zheng P, Xie P, Zhang Z, Yao H.(2019). Gut microbiota from NLRP3-deficient mice ameliorates depressive-like behaviors by regulating astrocyte dysfunction via circHIPK2. Microbiome. Aug 22;7(1):116. doi: 10.1186/s40168-019-0733-3. PMID: 31439031; PMCID: PMC6706943.
- Zhang, Y., Tu, S., Ji, X. et al. Dubosiella newyorkensis modulates immune tolerance in colitis via the L-lysine-activated AhR-IDO1-Kyn pathway. (2024). Nat Commun 15, 1333. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45636-x>.
- Zhang Y, Yu W, Flynn C, Chang W, Zhang L, Wang M, Zheng W, Li P. (2022). Interplay between Gut Microbiota and NLRP3 Inflammasome in Intracerebral Hemorrhage. Nutrients. 14(24):5251. <https://doi.org/10.3390/nu14245251>.